Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

„Rezeptorstatus des Kaninchenknochenmarks"

Dissertation

zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Klara Volmering

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0077

Aus dem Institut für Physiologische Chemie II
Direktor: Prof. Dr. W. Staib

„Rezeptorstatus des Kaninchenknochenmarks"

Dissertation

zur Erlangung eines Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Klara Volmering

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. G. Arnold

Referent
ge.: Prof. Dr. Bojar

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Moser

INHALT SEITE

EINLEITUNG 1

MATERIAL UND METHODEN 7

A Material 7
I. Tiere 7
II. Chemikalien 7
1. Radioaktiv markierte Hormone 7
2. Nicht-radioaktiv markierte Hormone 8
3. Weitere Chemikalien 8

B Methoden 10
I. Isolierung von Knochenmarkszellen 10
II. Untersuchungen zur Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung in intakten Zellen und im Zytosol 11
1. Physiko-chemische Grundlagen 11
2. Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten des Hormon-Rezeptor-Komplexes und seiner molaren Konzentration nach der Methode von SCATCHARD 12
2.1. Theoretische Grundlagen 12
2.2. Durchführung in intakten Zellen 13
2.3. Durchführung im Zytosol 15
3. Bestimmung der Ligandenspezifität der Rezeptorbindung in intakten Zellen und im Zytosol 17
3.1. Theoretische Grundlagen 17
3.2. Durchführung in intakten Zellen 17
3.3. Durchführung im Zytosol 18
III. Dichtegradientenzentrifugation 18
1. Theoretische Grundlagen 18
2. Durchführung 19
IV. Proteinbestimmung 20
1. Proteinbestimmung in Zellsuspensionen 20
2. Proteinbestimmung im Zytosol 21

SEITE

ERGEBNISSE 22

A. Ausbeute und morphologische Intaktheit von isolierten Knochenmarkszellen 22

B. Rezeptorstudien in intakten Knochenmarkszellen und in deren Zytosol 22

I. Charakterisierung des Östrogen-Rezeptor--Komplexes 22

1. Affinität des Östrogens zum Rezeptor in intakten Zellen 22

2. Affinität des Östrogens zum Zytosolrezeptor 24

3. Ligandenspezifität der Östrogenbindungsstellen im Zytosol 25

4. Untersuchungen über das Sedimentationsverhalten der Östrogen-bindenden Moleküle mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation 28

II. Charakterisierung des Gestagen-Rezeptor-Komplexes 29

1. Affinität des R 5020 zum Rezeptor in intakten Zellen 29

2. Affinität des R 5020 zum Zytosolrezeptor 30

3. Ligandenspezifität der Gestagenbindungsstellen im Zytosol 31

III. Charakterisierung des Androgen-Rezeptor-Komplexes 33

1. Affinität des R 1881 zum Rezeptor in intakten Zellen 33

2. Affinität des R 1881 zum Zytosolrezeptor 35

3. Ligandenspezifität der Androgenbindungsstellen in intakten Zellen 36

IV. Charakterisierung des Glukokortikoid-Rezeptor--Komplexes 38

1. Affinität des Dexamethasons zum Rezeptor in intakten Zellen 38

2. Ligandenspezifität der Dexamethasonbindungsstellen in intakten Zellen 39

V. Charakterisierung des Mineralokortikoid--Rezeptor-Komplexes 41
1. Affinität des Aldosterons zum Rezeptor in intakten Zellen 41
2. Affinität des Aldosterons zum Zytosolrezeptor 42

DISKUSSION 44

LITERATURVERZEICHNIS 57

EINLEITUNG

In der Klinik hat sich schon seit längerer Zeit eine endokrine Beeinflussung der geformten Bestandteile des Blutes und entsprechender Vorstufen im Knochenmark durch Steroidhormone - sowohl in physiologischen als auch in pharmakologischen Konzentrationsbereichen - gezeigt (Gordon, 1954).

Da die Steroidhormone (Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide) einen unterschiedlichen Einfluß auf die einzelnen Subpopulationen der Blut- bzw. Knochenmarkszellen ausüben, soll zunächst ein kurzer Überblick über die bisher klinisch festgestellten, aber in ihrem Wirkungsmechanismus noch nicht bekannten Effekte gegeben werden.

Besonders früh war eine Beeinflussung der Blutzellen (hauptsächlich der Thrombozyten) durch w e i b l i c h e S e x u a l h o r m o n e (Östrogene und Gestagene) bekannt.

Schon physiologisch ist die Zahl der Thrombozyten während des menstruellen Zyklus Schwankungen unterworfen, die sich proportional zum Östrogenspiegel im Plasma verhalten (Bargmann, 1967).

Entsprechend traten mit der Einführung hormoneller Kontrazeptiva als wichtige Nebenwirkung thromboembolische Komplikationen auf, die eine Abhängigkeit von der Östrogendosis aufwiesen, während eine mögliche Mitbeteiligung der Gestagene noch ungeklärt ist (Inman et al., 1970).

Die klinische Relevanz schlägt sich u.a. in statistischen Untersuchungen nieder, nach denen die Wahrscheinlichkeit einer Thromboembolie um das 10fache, die einer tödlichen Lungenembolie oder Hirnvenenthrombose um das 7fache bei Einnahme östrogenbetonter Kontrazeptiva erhöht ist (Stamm, 1975).

Die gesteigerte Gerinnbarkeit des Blutes ist jedoch nicht nur eine Folge der erhöhten Thrombozytenzahl, sondern auch auf Konzentrationsveränderungen einiger Gerinnungsfaktoren zurückzuführen.

Die m ä n n l i c h e n S e x u a l h o r m o n e (Androgene) scheinen hauptsächlich auf Erythrozyten und deren Vorstufen zu wirken.

Die um etwa 10% höherliegenden Werte des Hämoglobinspiegels und der Erythrozytenzahl des geschlechtsreifen Mannes gegenüber der Frau weisen schon in physiologischen Konzentrationsbereichen auf eine die Erythropoese fördernde Wirkung der Androgene hin.

Diese verstärkt sich entsprechend in pharmakologischen Konzentrationsbereichen, was sich histologisch als erythropoetische Hyperplasie des Knochenmarks verifizieren läßt (Kennedy, 1962).

Zur Erklärung werden die Möglichkeiten in Betracht gezogen, daß Androgene

- einerseits die Erythropoetinbildung in der Niere fördern (Träger, 1977),
- andererseits direkt auf die Stammzelle einwirken, indem sie diese für Erythropoetin ansprechbarer machen (Shahidi, 1973).

Leukozyten und Thrombozyten scheinen nicht unter dem Einfluß von Androgenen zu stehen.

Nur im Knochenmark der Ratte wurde unter hohen Testosterondosen ein Schwund der Lymphozyten festgestellt (Frey-Wettstein und Craddock, 1970).

Effekte der K o r t i k o s t e r o i d e (besonders der Glukokortikoide, dagegen weniger der Mineralokortikoide) auf Blutzellen sind bei fast allen Subpopulationen nachzuweisen.

Bei einer erhöhten Glukokortikoidkonzentration im Plasma (Glukokortikoidtherapie, Morbus Cushing, sowie vorübergehend im Zusammenhang mit physischen und emotionalen Stresssituationen) steigt die Zahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut an.

Diese Erscheinung soll
- einerseits auf einer beschleunigten Zellteilung und Freisetzung aus dem Knochenmark (Lennert, 1975),
- andererseits auf einem verminderten Austritt der Granulozyten aus der Blutbahn ("Gefäßabdichtung" durch Glukokortikoide) an den Entzündungsherden (Träger, 1977)

beruhen.

Die Zahl der Eosinophilen verhält sich im allgemeinen umgekehrt proportional zur Kortisolkonzentration im Plasma.

Dieses Verhalten ist so eindeutig nachgewiesen, daß ihm sogar ein diagnostischer Wert (Thorn-Test) zukommt.

Der Mechanismus dieser eosinopenischen Glukokortikoidwirkung ist bis heute nicht geklärt.
Als Ursachen stehen zur Diskussion:
- Hemmung des Nachschubes aus dem Knochenmark (bisher sich widersprechende Befunde; siehe u.a. Gordon, 1954),
- erhöhte Fixierung und Abbau in besonderen Organen (für das retikuloendotheliale System weitgehend bewiesen; siehe u.a. Romani, 1952) und
- direkte Zerstörung der Eosinophilen durch Glukokortikoide (durch Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen, obwohl eine Zunahme der Abbauformen beobachtet wurde; siehe u.a. Gordon, 1954).

Auf Grund der oben dargestellten Untersuchungsergebnisse nahm Gordon (1954) an, daß die Wirkung der Glukokortikoide auf

eine Sensibilisierung der Eosinophilen für Nebennieren-unabhängige Abbaukräfte und auf eine Ausschwemmungshemmung aus bestimmten Organen (Retikuloendothelien) zurückgeführt werden kann.

Unter einer Glukokortikoidtherapie zeigt sich im peripheren Blut, in den Lymphknoten und im Thymus eine Lymphopenie, die aus einem beschleunigten Abbau der Lymphozyten durch direkte Glukokortikoidwirkung resultieren soll (Turnell und Burton, 1975).

Die Thrombozytenzahl steigt mit der Glukokortikoidkonzentration und führt zu der bei Morbus Cushing und Kortisoltherapie bekannten Thromboseneigung.

Als Ursache werden eine gesteigerte Zellteilung und Freisetzung aus dem Knochenmark vermutet.

Eine mögliche Beeinflussung der Blutgerinnung über die Gerinnungsfaktoren, wie sie z.B. bei den Östrogenen nachgewiesen wurde, soll keine Rolle spielen.

Durch eine wahrscheinlich direkte Wirkung auf die Erythropoese verhält sich die Zahl der Erythrozyten proportional zum Glukokortikoidspiegel im Plasma.

Dies zeigt die Herabsetzung der Erythroblastenzahl nach Adrenalektomie (Gordon, 1954) bzw. die Polyglobulie des Morbus Cushing.

Für die unterschiedlichen Effekte der Steroidhormone auf die einzelnen Subpopulationen der Blut- bzw. Knochenmarkszellen kommen nach heutigen Erkenntnissen zwei Erklärungen in Betracht.

Die Steroidhormone könnten ihre Funktion
- indirekt durch Beeinflussung weiterer regulatorischer Größen (z.B. Wirkung auf die Erythropoetinsynthese),

- direkt durch Einwirkung auf ihr Zielorgan (Interaktion mit den Blut- bzw. Knochenmarkszellen)

erfüllen.

Da ich in meiner Arbeit den Schwerpunkt auf die Beurteilung der direkten Beeinflussung legte, ist zunächst die Definition des Begriffs der Ziel- bzw. Erfolgsorgane erforderlich.

Auf der molekularen Ebene sind Ziel- bzw. Erfolgsorgane dadurch charakterisiert, daß sie hormonspezifische Bindungsproteine besitzen, die an der intrazellulären Übertragung des hormonellen Signals beteiligt sind.
Diese Hormon-Bindungsproteine werden Hormonrezeptoren genannt.

Ein Hormonrezeptor ist wiederum durch fünf charakteristische Eigenschaften definiert, die ihn von einem unspezifischen Hormonbinder abgrenzen.
Nach Hechter und Halkerston (1964), Jungblut et al. (1967) und Jensen et al. (1968) müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein, um von einem Rezeptor sprechen zu können:

1. hohe Affinität zum Hormonmolekül;
2. hohe Spezifität;
3. begrenzte Kapazität;
4. Translozierbarkeit: Fähigkeit des zunächst zytoplasmatischen Hormon-Rezeptor-Komplexes, temperaturabhängig in den Kern überzugehen;
5. Aktivierung bestimmter DNA-Bereiche, wodurch z.B. Enzyminduktionen hervorgerufen werden.

Nach den oben beschriebenen Ausführungen können die Blut- bzw. Knochenmarkszellen nur dann als Zielorgan der Steroidhormone angesehen werden, wenn entsprechende Steroidhormon--bindende Makromoleküle in den Zellen identifiziert werden können.

Zur Charakterisierung der Steroidhormon-Rezeptor-Komplexe im Zytosol und in intakten Zellen habe ich im Rahmen

meiner Arbeit
- die Affinität des Rezeptors zum Hormonmolekül,
- die Bindungskapazität und
- die Spezifität der Bindung

untersucht.

Für die Versuche benutzte ich das Knochenmark des Kaninchens, nachdem Vorversuche an Wistar-Ratten gezeigt hatten, daß eine ausreichende Knochenmarksgewinnung aus den kleinen Röhrenknochen (Tibia und Femur) der Ratten technisch nicht befriedigend gelöst werden konnte.

Auf eine Auftrennung der Knochenmarkszellen in Subpopulationen mußte jedoch verzichtet werden, da für die Rezeptoranalytik in intakten Zellen ein hoher Materialbedarf erforderlich war, aber trotz verschiedener methodischer Ansätze nur eine vergleichsweise geringe Zellausbeute erzielt werden konnte.

MATERIAL UND METHODEN

A Material

I. Tiere

männliche Chinchilla-Kaninchen (1500-2000 g Körpergewicht)
aus der Tierversuchsanlage Meerbusch-Osterath

II. Chemikalien

1. Radioaktiv markierte Hormone

($1,2-^3H$)-Dexamethason,
spezifische Aktivität: 24-38 Ci/mmol
Hersteller: Amersham-Buchler, Braunschweig

($6,7-^3H$)-Östradiol-17ß,
spez. Akt.: 41-60 Ci/mmol
Hersteller: Amersham-Buchler, Braunschweig;
New England Nuclear, Boston (USA)

(17α-Methyl-^3H)-Promegeston
(R 5020: 17,21-dimethyl-19-norpregna-4,9-dien-3,20-dion),
spez. Akt.: 87 Ci/mmol
Hersteller: New England Nuclear, Boston (USA)

(17α-Methyl-^3H)-Methyltrienolon
(R 1881: 17ß-hydroxy-17α-methyl-estra-4,9,11-trien-3-on),
spez. Akt.: 87 Ci/mmol
Hersteller: New England Nuclear, Boston (USA)

($1,2-^3H$)-Aldosteron,
spez. Akt.: 47 Ci/mmol
Hersteller: New England Nuclear, Boston (USA)

Die Reinheit der verwendeten Chemikalien wurde monatlich durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen auf Fertigplatten der Firma Merck, Darmstadt (Kieselgel 60 F-254) in Chloroform : Äthanol (8:2, v:v) überprüft und mittels eines Dünnschicht-Scanners, Typ LB 2721 (Berthold, Wildbach) ausgewertet.

2. Nicht-radioaktiv markierte Hormone

Dexamethason, Kortikosteron, Kortisol, Östradiol, Östron, Östriol, Progesteron, Dihydrotestosteron, Testosteron, Aldosteron
Hersteller: Calbiochem, San Diego (USA)

Diäthylstilböstrol (DES)
Hersteller: Merck, Darmstadt

Promegeston (R 5020), Methyltrienolon (R 1881)
Hersteller: New England Nuclear, Boston (USA)

3. Weitere Chemikalien

Liquemin
(25000 USP-E. Natriumheparinat)
Hersteller: Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

Evipan-Natrium
(0,5 g Natriumsalz der Methyl-cyclo-hexenyl-methyl--barbitursäure/5 ml)
Hersteller: Bayer, Leverkusen

Dextran T 500
Hersteller: Pharmacia, Uppsala (Schweden)

Norit A
Hersteller: Serva, Heidelberg

Tris-HCl
(Tris- (hydroxymethyl) -aminomethan-hydrochlorid)
Hersteller: Serva, Heidelberg

EDTA
(Titriplex III: Äthylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz)
Hersteller: Merck, Darmstadt

Biofluor
Hersteller: New England Nuclear, Boston (USA)

Quickszint 212
Hersteller: Zinsser, Frankfurt

Die übrigen verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.A..

B Methoden

I. Isolierung von Knochenmarkszellen

Nach Vorversuchen mit Wistar-Ratten ergaben sich hauptsächlich zwei Probleme:
- eine genügend hohe Zellausbeute aus den kleinen Röhrenknochen (Tibia und Femur) der Ratten zu erhalten;
- die gewonnenen Knochenmarkszellen intakt zu halten, was sich bei der Notwendigkeit des Zentrifugierens als sehr schwierig erwies.

Diese Probleme konnten durch Verwendung junger Chinchilla-Kaninchen (1,5 kg) als Versuchsobjekte gelöst werden.

Die Narkotisierung der Kaninchen erfolgte mit 0,7 ml Evipan/kg Körpergewicht (entsprechend 0,07 g Hexobarbital/kg) unter Zusatz von 1,2 ml Liquemin/kg Körpergewicht (entsprechend 6000 USP-E. Natriumheparinat/kg).
Beide Substanzen wurden in die oberflächlichen Ohrvenen der Kaninchen injiziert.

Danach wurden auf beiden Seiten Femur und Tibia freipräpariert, exartikuliert und sofort in eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung abgekühlt.

Die eigentliche Zellgewinnung erfolgte nach Brechung der Knochen an beiden Enden durch Auslöffeln des Knochenmarks mittels eines Spatels und durch anschließendes Ausblasen der Markkanäle mit einer Spritze.

Das gewonnene Material wurde in einem silanisierten Becherglas aufgefangen, nach Bestimmung des Gewichts je nach Assaymethode in dem entsprechenden Puffer suspendiert und durch ein Nylonnetz (Maschenweite 150 µm) filtriert, so daß gröbere Teilchen, die sich nicht hatten auflösen lassen, zurückgehalten wurden.

Abschließend wurde die so erhaltene Zellsuspension lichtmikroskopisch hinsichtlich der Intaktheit der Zellen kontrolliert.

II. Untersuchungen zur Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung in intakten Zellen und im Zytosol

1. Physiko-chemische Grundlagen

Die nachfolgend beschriebenen Methoden dienen zur Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) der Hormon-Rezeptor-Komplexe, sowie der maximalen Bindungskapazität (MBC) und Ligandenselektivität der Rezeptoren.

Sowohl in intakten Zellen als auch im Zytosol unterscheidet man die spezifische und unspezifische Bindung eines Hormons.
Die spezifische Bindung des Hormons an das eigentliche Rezeptorprotein ist durch eine hohe Affinität bei geringer Kapazität, die unspezifische Bindung an Nicht-Rezeptorproteine dagegen durch geringe Affinität bei hoher Kapazität charakterisiert (King und Mainwaring, 1974).

Zur Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung wird einem Ansatz nur Tritium-markiertes Hormon zugesetzt, in der Annahme, daß sich das markierte Hormon sowohl an die spezifischen Proteine (Rezeptoren) als auch an unspezifische, mit dem Hormon reagierende Proteine bindet und somit die totale Bindung wiedergibt. Ein Parallelansatz mit einem Überschuß an nicht-markiertem Hormon, welches das radioaktiv-markierte Hormon von den hochaffinen, nicht jedoch von den niedrigaffinen Bindungsstellen mit hoher Kapazität verdrängt, entspricht der unspezifischen Bindung, so daß sich die spezifische Bindung als Differenz zwischen totaler und nicht-spezifischer Bindung berechnen läßt (King und Mainwaring, 1974).

Die Kompetitionsfähigkeit eines nicht-markierten Testhormons, das in steigenden Konzentrationen zusammen mit einer konstanten Konzentration tritiierten Hormons den Proben zugesetzt wird, läßt sich dementsprechend durch die Verdrängung des tritiierten Hormons aus der Hormon--Rezeptorbindung charakterisieren.

2. Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten des Hormon-Rezeptor-Komplexes und seiner molaren Konzentration nach der Methode von SCATCHARD

2.1. Theoretische Grundlagen

Bei der Interpretation der Hormon-Rezeptor-Wechselbeziehung wird vorausgesetzt, daß jeweils nur ein Steroidmolekül von einem Rezeptormolekül reversibel gebunden werden kann.

Dies läßt sich durch folgende Reaktionsgleichung wiedergeben:

$$[\text{Hormon}] + [\text{Rezeptor}] \rightleftharpoons [\text{Hormon-Rezeptor-Komplex}]$$

$$H + [R] \rightleftharpoons [H\text{-}R]$$

Die scheinbare Assoziationskonstante (K_a) und Dissoziationskonstante (K_d) dieser Reaktion ergeben sich dann aus folgender Gleichung gemäß dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_a = \frac{[H\text{-}R]}{[H] \times [R]} = \frac{1}{K_d}$$

In einer Titrationsanalyse werden dem Zytoplasma bzw. der Zellsuspension zur Bestimmung der totalen Bindung ausschließlich steigende Konzentrationen eines tritiierten Hormons zugefügt; die Bestimmung der unspezifisch gebundenen Hormonmenge erfolgt in Parallelansätzen, die zusätzlich einen Überschuß an nicht-markiertem Hormon enthalten.

Die Differenz ergibt, wie oben schon ausgeführt wurde, die spezifisch gebundene Hormonmenge.

Das freie, nicht gebundene Hormon läßt sich aus den bekannten Konzentrationen des zugesetzten tritiierten Hormons und der spezifisch gebundenen Hormonmenge bestimmen.

Nach der Methode von SCATCHARD (1949) trägt man den Quotienten aus den Konzentrationen des spezifisch gebundenen und des freien Hormons auf der Ordinate gegen die molare Konzentration des spezifisch gebundenen Hormons auf der Abszisse auf.

Anhand der resultierenden Geraden läßt sich aus deren Steigung die scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) und aus ihrem Schnittpunkt mit der Abszisse die maximale Hormonbindungskapazität (MBC) bestimmen.

2.2. Durchführung in intakten Zellen

Die Knochenmarkszellen wurden nach dem im Abschnitt I. geschilderten Verfahren gewonnen und in Krebs-Ringer--Phosphatpuffer, pH 7,4 , zu einer 10%igen Zellsuspension verdünnt.

Diese wurde zur einen Hälfte mit einer bestimmten Menge an "kaltem" Hormon (Dexamethason, Diäthylstilböstrol, R 5020, R 1881, Aldosteron; Konzentration: 1 µmol/l) versetzt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb.

Das Tritium-markierte Hormon wurde in den jeweils gewünschten Konzentrationsbereichen von

Dexamethason	1,0 - 7,0 x 10^{-9} mol/l,
Östradiol	0,4 - 3,0 x 10^{-9} mol/l,
R 5020	1,5 - 11,0 x 10^{-9} mol/l,
R 1881	0,2 - 2,6 x 10^{-9} mol/l,
Aldosteron	0,15 - 2,0 x 10^{-9} mol/l

mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (pH 7,4) auf ein Volumen von 3 ml verdünnt, da das Pipettieren kleiner Volumina (im 10 ul-Bereich), wie Vorversuche zeigten, eine zu große Streuungsbreite aufwies.

Die Herstellung der einzelnen Ansätze erfolgte in silanisierten 25 ml Glas-Szintillationsröhrchen.
Für die Bestimmung der totalen Bindung wurden jeweils 1 ml der unbehandelten Zellsuspension mit 1 ml des in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer aufgenommenen, tritiierten Hormons inkubiert; in Parallelansätzen wurde für die Bestimmung der unspezifischen Bindung lediglich die unbehandelte Zellsuspension durch die mit nicht-markiertem Hormon vorbeladene Zellsuspension ersetzt.

Die Ansätze wurden in einem Schüttelbad (Frequenz: 120/min; Amplitude: 2,5 cm) bei 37°C über 30 Minuten inkubiert und dann in drei 500 ul Portionen aufgeteilt, um bei der weiteren Aufarbeitung und Auswertung eine größere Genauigkeit zu erzielen.

Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang, durch den die noch nicht gebundene Aktivität entfernt werden sollte.
Dieser setzte sich zusammen aus einer 15-sekündigen Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge, Typ 3200 (12.000 Upm), dem Absaugen des Überstandes und der Resuspension des Pellets in 1 ml 5%iger Albuminlösung (pH 7,4).

Die jetzt noch verbliebene, gebundene Radioaktivität wurde nach erneuter Zentrifugation - analog zum Verfahren des Waschvorgangs - durch Aufnahme des Zellsedimentes in 500 µl Äthanol abs. und 30-minütige Inkubation bei 18 - 20°C extrahiert.

Nach einer abschließenden 4-minütigen Zentrifugation in

der Eppendorf-Zentrifuge (Typ 3200) wurde der Überstand mit 5 ml Biofluor in Polyäthylen-Szintillationsgefäße gegeben und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Tri-Carb 2650) bestimmt.

2.3. Durchführung im Zytosol

Die Knochenmarkszellen wurden nach dem im Abschnitt I. geschilderten Verfahren gewonnen, mit eiskaltem TE-Puffer (1,5 mmol/l Titriplex III; 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8) im Verhältnis 1 : 1,5 (w : v) verdünnt und unter Kühlung mit einer Einmalspritze und Braunüle 1,0 durch wiederholtes Ansaugen der Suspension und Ausdrücken homogenisiert (ca. 30 Minuten).
Der Grad der Zytolyse wurde mikroskopisch kontrolliert.

Anschließend wurde das Homogenat 45 Minuten bei 0 - 3°C und 105.000 x g zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, Typ L5-75, Rotor TI 75), um das Zytosol, den 105.000 x g-Überstand, zu gewinnen.

Der auf dem Zytosol schwimmende Lipidfilm wurde mit einer Pasteur-Pipette durchstochen und der Überstand dann so abgesaugt, daß das Sediment nicht aufwirbelte und sich mit dem Zytosol vermischte.

Je 200 µl des Zytosols wurden einmal mit tritiiertem Hormon in Konzentrationsbereichen von

Östradiol	$0{,}2 - 1{,}4 \times 10^{-9}$ mol/l,
R 5020	$0{,}9 - 6{,}5 \times 10^{-9}$ mol/l,
R 1881	$0{,}3 - 2{,}1 \times 10^{-9}$ mol/l,
Aldosteron	$0{,}5 - 3{,}8 \times 10^{-9}$ mol/l

zur Bestimmung der totalen Bindung oder zusammen mit unmarkiertem Hormon (Konzentration: 1 µmol/l für alle nicht-markierten Hormone) für die Erfassung der unspezifischen Bindung 3 Stunden bei 0°C inkubiert.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von 500 µl Dextrankohle-Reagenz beendet, da hierdurch einerseits das nicht gebundene Hormon, andererseits ein Großteil des unspezifisch gebundenen Hormons von der Kohle adsorbiert wurde.

Für die Herstellung des Dextrankohle-Reagenzes wurden über Nacht bei 0 - 4°C 2,5 g Norit A in 250 ml Puffer (0,5 g Dextran T 500; 1,5 mmol/l Titriplex III; 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8) auf einem Magnetrührer suspendiert. Zum Waschen wurde die Dextran-beschichtete Kohle dreimal in je 250 ml des oben beschriebenen Puffers suspendiert und bei niedrigen Drehzahlen über 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Sediment in 250 ml des gleichen Puffers aufgenommen und bei 0 - 2°C aufbewahrt.
Vor Gebrauch mußte die Kohle jeweils auf dem Magnetrührer resuspendiert werden.

Nach 10-minütiger Inkubation des Zytosols mit dem Dextrankohle-Reagenz bei 4 - 7°C wurden die Ansätze 4 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge, Typ 3200 (12.000 Upm), zentrifugiert und jeweils 200 µl des kohlefreien Überstandes mit 5 ml Quickszint 212 in Polyäthylen-Szintillationsgefäße gegeben und die Radioaktivität bestimmt.

Da unter diesen Bedingungen der - wie schon länger bekannt - sehr labile Aldosteronrezeptor nicht erfaßt werden konnte, wurde die obige Methode modifiziert, indem schon jeweils 300 µl des Homogenates entweder nur mit tritiiertem Aldosteron oder zusätzlich mit nicht-markiertem Hormon versetzt wurden.

Erst dann wurden die Proben 5 Minuten in einer Beckman-Airfuge, einer mit Pressluft betriebenen Ultrazentrifuge, bei einem Druck von 30 PSI (1 PSI = 68,9467 mbar), entsprechend 100.000 Upm, zentrifugiert.

Der Überstand, das schon mit Hormon beladene Zytosol, wurde 2 Stunden bei 0 - 3°C inkubiert; die weitere Verarbeitung erfolgte entsprechend dem soeben beschriebenen

Verfahren.

3. Bestimmung der Ligandenspezifität der Rezeptorbindung in intakten Zellen und im Zytosol

3.1. Theoretische Grundlagen

Bei dieser Methode werden den Rezeptorproteinen außer dem spezifischen, mit Tritium markierten, Hormon nichtmarkierte Testhormone aller Steroidhormongruppen in steigenden Konzentrationen angeboten.

Je nach Konzentration und Affinität des Testhormons zum Rezeptor ist das Ausmaß der ^{3}H-Hormon-Rezeptorbindung mehr oder weniger eingeschränkt.

Die Kompetitionsfähigkeit der einzelnen Testhormone läßt sich durch Ermittlung der molaren Konzentration des Testhormons, die 50% des tritiierten Hormons aus der Rezeptorbindung verdrängt, charakterisieren.

3.2. Durchführung in intakten Zellen

Analog zum Verfahren II.2.2. wurde eine 5%ige Zellsuspension hergestellt.

Jeweils 2 ml der Zellsuspension wurden mit einer konstanten Konzentration an tritiiertem Hormon,

Dexamethason	$5{,}2 \times 10^{-9}$ mol/l bzw.
R 1881	$2{,}2 \times 10^{-9}$ mol/l,

und mit nicht-markierten Testhormonen im Konzentrationsbereich von 2×10^{-9} mol/l bis zu 1×10^{-6} mol/l versetzt.

Zur Bestimmung der totalen Bindung wurden außerdem Ansätze unter gleichen Bedingungen ohne Zusatz von nicht-

-markiertem Hormon hergestellt.

Die weitere Verarbeitung der Ansätze erfolgte entsprechend der Methode, die bei der Titrationsanalyse in intakten Zellen angewendet worden ist (II.2.2.).

3.3. Durchführung im Zytosol

Jeweils 200 µl Zytosol (Herstellung analog zu II.2.3.) wurden mit 1,5 x 10^{-9} mol/l tritiiertem Östradiol bzw. 7 x 10^{-9} mol/l tritiiertem R 5020 und mit einem bis zu 1000fachen Überschuß an nicht-markierten Kompetitoren inkubiert.

Die Verarbeitung entsprach dem unter Titrationsanalyse im Zytosol (II.2.3.) beschriebenen Verfahren.

II. Dichtegradientenzentrifugation

1. Theoretische Grundlagen

Die Methode der Dichtegradientenzentrifugation stellt eine Modifikation der von Toft und Gorski (1966), Korenman und Rao (1968a) und Jensen et al. (1969) entwickelten Analysentechnik dar.

Die Grundlage dieses Verfahrens beruht auf dem Verhalten von Makromolekülen, die während einer definierten Zentrifugationszeit in einem Zentrifugalfeld je nach ihrer Masse (bei idealisierter Kugelform) eine bestimmte Strecke zurücklegen.
Es kommt daher zur Auftrennung der Moleküle durch Anreicherung von Teilchen gleicher Masse in gleichen Zonen (Banden).

Die Bande einer betrachteten Makromolekularfraktion wird

durch den Sedimentationskoeffizienten S (1 S = 1 Svedberg = 10^{-13} sec) angegeben, der durch folgende Gleichung charakterisiert wird:

$$S = \frac{1}{\omega^2 r} \times \frac{dr}{dt}$$

ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors in U/sec
r = Abstand zwischen der Sedimentationsbande und der Rotationsachse
t = Zentrifugationszeit in sec

Die gängigen Methoden wurden von Martin und Ames (1961) durch den von ihnen gewählten Saccharosegradienten wesentlich modifiziert.
Dieser hat den Vorteil, daß Dichte bzw. Viskosität so gewählt sind, daß ein nahezu gleichbleibendes Wanderungsverhalten der meisten Makromoleküle im Zentrifugationsfeld gewährleistet ist.

2. Durchführung

Jeweils 200 µl Zytosol (Herstellung analog zu II.2.3.) wurden bei 0 - 3°C entweder nur mit 2,5 nmol/l tritiiertem Östradiol für die Bestimmung der totalen Bindung oder zusammen mit 1 µmol/l nicht-markiertem Diäthylstilböstrol (DES) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung über 20 Stunden inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden 500 µl Dextran-beschichtetes Kohleadsorbens 4 Minuten bei 12.000 Upm in einer Eppendorf-Zentrifuge (Typ 3200) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das inkubierte Zytosol mit dem Kohlesediment vermischt.

Nach einer 10-minütigen Inkubation der Ansätze bei 0 - 3°C wurden diese nochmals 4 Minuten in der Eppendorf-Zentri-

fuge (Typ 3200; 12.000 Upm) zentrifugiert und die Überstände auf einen linearen 5 - 20%igen (w : v) Saccharose--Dichtegradienten in Homogenisationsmedium (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8; 1,5 mmol/l $MgCl_2$; 5 mmol/l ß-Mercaptoäthanol) aufgeschichtet.

Diese Gradienten wurden bei 0 - 3°C in einer Beckman Ultrazentrifuge (Typ L8-80, Vertikalrotor VTI 80) 2 Stunden bei 80.000 Upm zentrifugiert.

Anschließend wurden die Böden der Zentrifugationsröhrchen durchstochen und jeweils Fraktionen von 4 Tropfen in Polyäthylen-Szintillationsgefäßen gesammelt, mit 5 ml Quickszint 212 versetzt und die Radioaktivität in einem LS 9000 (Beckman)-Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

IV. Proteinbestimmung

1. Proteinbestimmung in Zellsuspensionen

Der Proteingehalt von Zellsuspensionen wurde mit Hilfe des Biuret-Reagenzes (Weichselbaum, 1946; Richterich, 1971) bestimmt.

Die Eichkurve wurde ermittelt, indem steigende Mengen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung (0,1 - 2,0 ml) mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 2,5 ml verdünnt und mit je 5 ml Biuret-Reagenz versetzt wurden.
Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Die Extinktionen wurden bei 546 nm gegen einen Leerwert (bestehend aus 2,5 ml 0,9%iger NaCl und 5 ml Biuret-Reagenz) in einem Eppendorf-Photometer (Typ 1101 M) bestimmt.

Anhand der ermittelten Werte wurde eine Eichkurve aus der

Verbindungslinie der auf der Ordinaten aufgetragenen Extinktionswerte gegen die Eiweißkonzentrationen auf der Abszisse erstellt.

0,2 ml der Zellsuspension wurde mit 0,2 ml 2 N NaOH 90 Minuten bei 60 °C im Wasserbad hydrolisiert, abgekühlt, mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 2,5 ml aufgefüllt, mit 5 ml Biuret-Reagenz versetzt und dann bei 18 - 20°C 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

Die Messung der Extinktion erfolgte analog zu den Messungen für die Aufstellung der Eichkurve.

2. Proteinbestimmung im Zytosol

Der Proteingehalt von Zytosolen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt.

Zur Aufstellung der Eichkurve wurden steigende Mengen einer 0,01%igen Rinderserumalbuminlösung (0,2 - 1,0 ml) mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, mit je 0,5 ml Reaktionslösung (1 ml KNa-tartrat x 4 H_2O [4%]; 1 ml $CuSO_4$ x 5 H_2O [2%]; 98 ml Na_2CO_3 [4%] in 0,2 N NaOH) versetzt und 10 Minuten bei 20°C inkubiert.

Nach Zugabe von 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz und nochmaliger Inkubation von 30 Minuten bei 20°C wurden die Extinktionen der Ansätze bei 578 nm in einem Eppendorf--Photometer, Typ 1101 M, gegen einen Leerwert gemessen, der aus 1 ml Wasser, 0,5 ml Reaktionslösung und 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz bei gleicher Vorbehandlung bestand.

Aus den ermittelten Werten konnte die Eichkurve erstellt werden, mit deren Hilfe der Proteingehalt von 1 ml Zytosol, das im Verhältnis 1 : 100 mit Wasser verdünnt wurde und danach die gleiche Behandlung wie oben erfuhr, bestimmt werden konnte.

ERGEBNISSE

A. Ausbeute und morphologische Intaktheit von isolierten Knochenmarkszellen

Durch Auslöffeln und Ausblasen des Knochenmarks mit einem Spatel und einer Spritze wurden etwa 2 g Knochenmarkszellen (Feuchtgewicht) aus den Knochen (Tibia und Femur) des Chinchilla-Kaninchens gewonnen, nachdem Vorversuche mit Wistar-Ratten einige Probleme aufgeworfen hatten (vgl. Methoden I., Isolierung von Knochenmarkszellen).

Die Zellzahl wurde nach einer Verdünnung von 1 : 20 bestimmt und betrug im Mittel ca. $6{,}2 \times 10^8$ Zellen/g Feuchtgewicht.

Nach der Biuret-Methode (vgl. Methoden IV.1., Proteinbestimmung in Zellsuspensionen) ergab sich ein Proteingehalt von 200 ($\pm$ 30 STDM; STDM = Standardabweichung des Mittelwerts) mg für 1 g Zellfeuchtgewicht (n = 60).

Die morphologische Intaktheit der gewonnenen Knochenmarkszellen wurde durch Zugabe von Trypanblau (Gibco) geprüft, das die Zellkerne nur dann anfärben kann, wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist.
Etwa 98% der Knochenmarkszellen nahmen den Farbstoff nicht auf und erwiesen sich damit als intakt.

B. Rezeptorstudien in intakten Knochenmarkszellen und in deren Zytosol

I. Charakterisierung des Östrogen-Rezeptor-Komplexes

1. Affinität des Östrogens zum Rezeptor in intakten Zellen

Die Bestimmung der scheinbaren Dissoziationskonstanten (K_d) für den Östrogen-Rezeptor-Komplex in intakten Zellen er-

folgte mit Hilfe des Ganzzellassays.

Die Versuchsansätze wurden 30 Minuten bei 37°C mit (6,7-^{3}H)-Östradiol-17ß in steigenden Konzentrationen (0,4 - 3,0 nmol/l) inkubiert.
Parallelansätze enthielten zusätzlich als Kompetitor einen 1000fachen Überschuß an nicht-markiertem DES (Diäthylstilböstrol).

Die Quotienten aus den Konzentrationen des spezifisch gebundenen 17ß-Östradiol zum freien Östradiol wurden gegen die molaren Konzentrationen des spezifisch gebundenen Östradiols aufgetragen und durch die gewonnenen Punkte eine Verbindungslinie gelegt, deren Verlauf nach der Methode der kleinsten Quadrate (Martin et al., 1975) berechnet wurde.

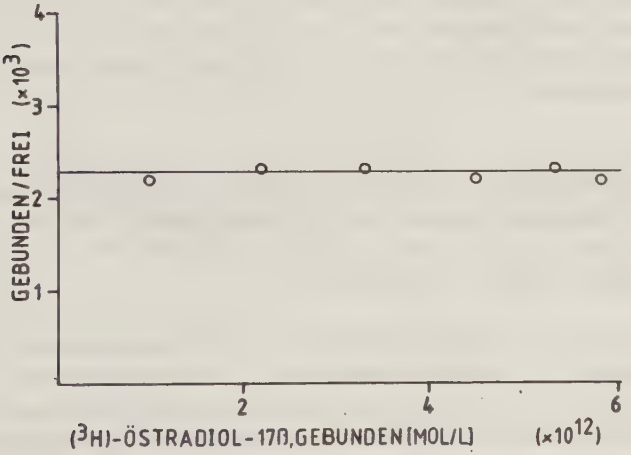


Abb.1: Scatchardanalyse der Östrogenbindung in intakten Knochenmarkszellen

Abbildung 1 zeigt einen parallel zur Abszisse verlaufenden Scatchard-Plot.

Aus diesem Verlauf der Geraden kann gefolgert werden, daß unter den Bedingungen des Ganzzellassays lediglich unspezifische, nicht-sättigbare Bindung erfaßt wurde.

2. Affinität des Östrogens zum Zytosolrezeptor

Die scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) der Östrogen--Rezeptor-Komplexe und die maximale Kapazität der zytoplasmatischen Bindungsstellen wurden ebenfalls nach der Methode von Scatchard ermittelt.

Dazu wurden die Proben entweder nur mit steigenden Konzentrationen des tritiierten Hormons (0,2 - 1,4 nmol/l) oder zusätzlich mit nicht-markiertem DES (1 µmol/l) versetzt und 3 Stunden bei 0 - 3°C inkubiert.
Freies Hormon wurde mit Hilfe der Dextrankohle-Methode entfernt.

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte analog zu I.1.. Die Steigung der resultierenden Geraden wird als Maß für die Dissoziationskonstante (K_d) angesehen, der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht der maximalen Hormonbindungskapazität (MBC) der Rezeptoren.

Im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen zeigte der Scatchard-Plot einen monophasischen, nicht-horizontalen Verlauf (vgl. Abb. 2), d.h. im Gegensatz zum Scatchard-Plot in intakten Zellen, der keine spezifische Bindung aufwies, lag im Zytosol eine spezifische Bindungskomponente für 17ß-Östradiol vor.

Es ergab sich für die Dissoziationskonstante (K_d) ein Wert von 2,3 ($\pm$ 0,41) x 10^{-10} mol/l ($\bar{x} \pm s_x$, n = 6).

Die mittlere maximale Bindungskapazität (MBC) im Zytosol betrug 8,2 ($\pm$ 4,8) fmol/mg Zytosolprotein ($\bar{x} \pm s_x$, n = 6).

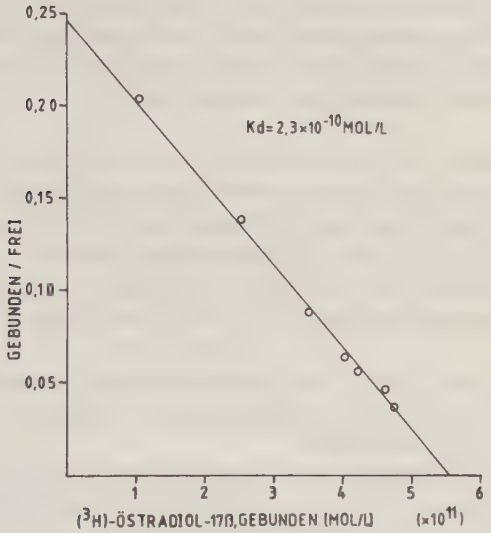


Abb.2: Ergebnis einer repräsentativen Scatchardanalyse für Östrogenrezeptoren im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen

3. Ligandenspezifität der Östrogenbindungsstellen im Zytosol

Zur weiteren Charakterisierung des Östrogenrezeptors im Zytosol der Knochenmarkszellen wurde die Ligandenspezifität der Bindungsstellen mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindung überprüft.

Dazu wurde das aus den Knochenmarkszellen gewonnene Zytosol (200 µl) jeweils mit nicht-markiertem DES und anderen

Steroiden in Konzentrationen von 2 x 10^{-9} bis 1 x 10^{-6} mol/l und mit 1,5 x 10^{-9} mol/l (6,7-^{3}H)-Östradiol-17ß über 3 Stunden bei 0 - 3°C inkubiert.
Anschließend wurde das freie Hormon mit dem Dextrankohle--Reagenz von dem gebundenen Hormon getrennt.
Die totale Bindung wurde unter gleichen Versuchsbedingungen in Parallelansätzen ermittelt, die nur 1,5 x 10^{-9} mol/l tritiiertes 17ß-Östradiol enthielten.

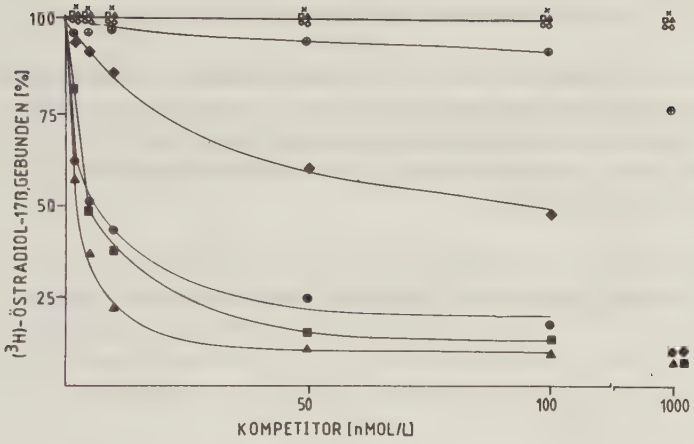
Die Hemmung der (^{3}H)-Östradiol-Rezeptorbindung (Prozentwert von der totalen Bindung) wurde gegen die molare Konzentration der nicht-markierten Testhormone aufgetragen.
Als Maß für die Kompetitionsfähigkeit wurde die molare Konzentration des Testhormons bestimmt, die 50% des tritiierten Hormons aus seiner spezifischen Bindung verdrängt.

In Abbildung 3 wird eine repräsentative Kompetitionsstudie mit den verschiedenen Testhormonen dargestellt.

Es wird ersichtlich, daß lediglich Kompetitoren mit östrogener Aktivität, wie die natürlichen Östrogene (Östradiol, Östriol, Östron) und das synthetische Östrogen (Diäthylstilböstrol), kompetierend wirkten.
Dabei fiel auf, daß die natürlichen Östrogene im niedrigen Konzentrationsbereich (bis zu 10^{-7} mol/l) sehr viel stärker das Tritium-markierte Hormon aus seiner Bindung verdrängten als das verwendete, synthetische Hormon.
Dieses unterschiedliche Verhalten änderte sich aber im hohen Konzentrationsbereich (10^{-6} mol/l), da hier natürliche Hormone und synthetisches Hormon gleich stark kompetierten.

Im hohen Konzentrationsbereich zeigte auch das synthetische Androgen (R 1881) eine geringe Kompetitionsfähigkeit.

Alle übrigen Steroidhormone erwiesen sich als nicht kompetierend.



KOMPETITOR	KOMPETITION 50% [nMOL/L]
ÖSTRADIOL	1,5
ÖSTRON	4,5
DIÄTHYLSTILBÖSTROL	67,1
ÖSTRIOL	4,6
R 1881	NICHT ZU BESTIMMEN
TESTOSTERON	
DIHYDROTESTOSTERON	
PROGESTERON	
DEXAMETHASON	
ALDOSTERON	

Abb.3: Hemmung der (^{3}H)-Östradiol-Rezeptorbindung durch verschiedene Testhormone im Zytosol von Knochenmarkszellen

4. Untersuchungen über das Sedimentationsverhalten der Östrogen-bindenden Moleküle mit Hilfe der Saccharose--Dichtegradientenzentrifugation

Die Bestimmung des Sedimentationsverhalten der Östrogen--bindenden Rezeptormoleküle wurde in einem 5 - 20%igen Saccharose-Dichtegradienten durchgeführt.
Das genaue Verfahren ist im Abschnitt Methoden III.2. beschrieben worden.

Das tritiierte Hormon wurde in einer Konzentration von 2,5 nmol/l eingesetzt; Parallelansätze enthielten zusätzlich 1 x 10^{-6} mol/l nicht-markiertes DES als Kompetitor.

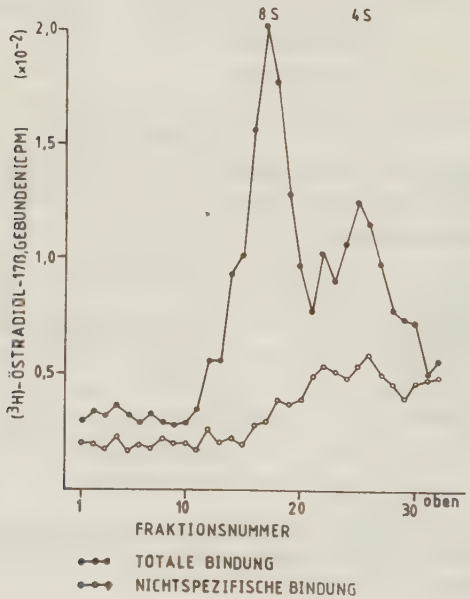


Abb.4: Sedimentationsprofil von (^{3}H)-Östradiol-17ß-bindenden Makromolekülen im Zytosol von Knochenmarkszellen

Auf der Abbildung 4 ist das typische Sedimentationsprofil von 17ß-Östradiol-bindenden Makromolekülen im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen zu sehen.

Sowohl in der 8S-Region als auch in der 4S-Region ließ sich bei Bestimmungen in niedrigen Salzkonzentrationen jeweils ein Radioaktivitätsmaximum erkennen; dies deutet auf ein spezifisch Östradiol-bindendes Makromolekül hin.

II. Charakterisierung des Gestagen-Rezeptor-Komplexes

Zur Charakterisierung des Progesteronrezeptors wurde das synthetische Gestagen, R 5020 (Promegeston), benutzt.

1. Affinität des R 5020 zum Rezeptor in intakten Zellen

Die Methode und Auswertung entsprachen den Ausführungen zu I.1. (Affinität des Östrogens zum Rezeptor in intakten Zellen).

Zur Titration der Rezeptoren mit R 5020 wurden die Versuchsansätze mit steigenden Konzentrationen des (^{3}H)-R 5020 ($1{,}5 - 11{,}0 \times 10^{-9}$ mol/l) versetzt.
Parallelansätze enthielten zusätzlich je 1 µmol/l nicht-markiertes R 5020.

In Abbildung 5 zeigt der horizontale Verlauf des Scatchard-Plots, daß unter den Bedingungen des Ganzzellassays lediglich unspezifische, nicht-sättigbare Bindung erfaßt werden konnte.

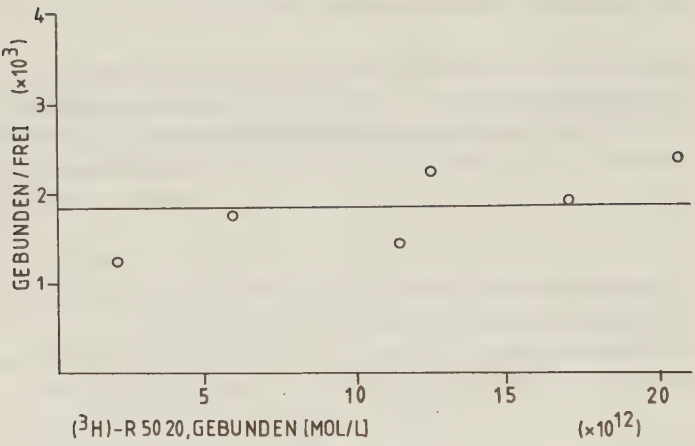


Abb.5: Scatchardanalyse der R 5020-Bindung in intakten Knochenmarkszellen

2. Affinität des R 5020 zum Zytosolrezeptor

Zur Äquilibrierung der Rezeptoren wurden die Proben mit tritiiertem R 5020 in einem Konzentrationsbereich von 0,9 bis 6,5 x 10^{-9} mol/l versetzt und Parallelansätzen nicht-markiertes R 5020 im 1000fachen Überschuß zugefügt.

Die weitere Aufarbeitung und Auswertung erfolgten analog zu I.2. (Affinität des Östrogens zum Zytosolrezeptor).

Im Gegensatz zum Scatchard-Plot in intakten Zellen ließ sich im Zytosol eine spezifische Bindungskomponente für R 5020 nachweisen (vgl. Abbildung 6).

Aus dem Verlauf der Geraden konnte für die Dissoziations-

konstante (K_d) ein Wert von 3,9 ($\pm$ 3,1) x 10^{-9} mol/l errechnet werden.

Die maximale Bindungskapazität (MBC) im Zytosol betrug 4,8 ($\pm$ 2,3) fmol/mg Zytosolprotein ($\bar{x} \pm s_x$, $n = 6$).

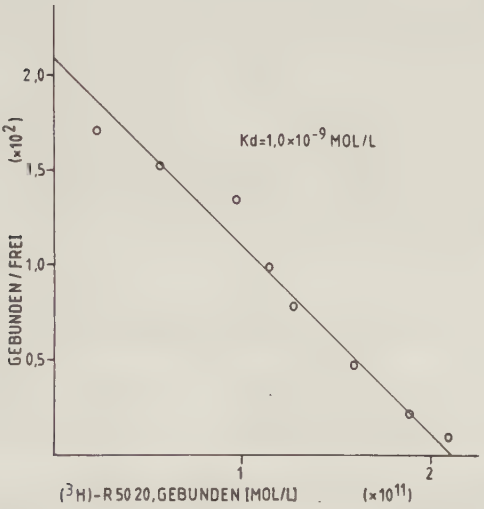
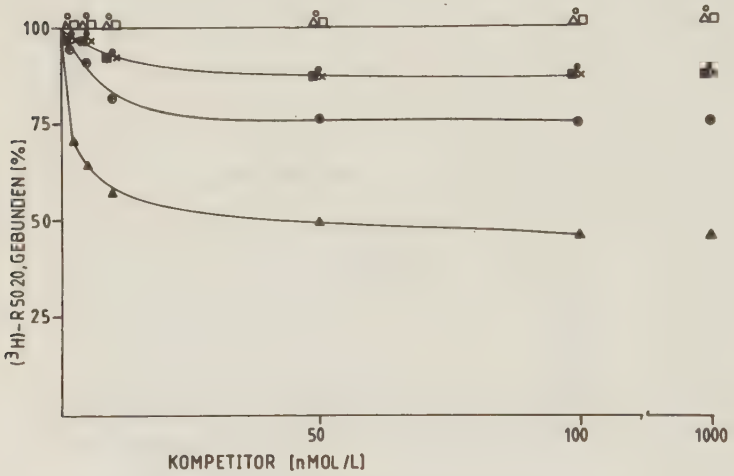


Abb.6: Ergebnis einer typischen Scatchardanalyse für R 5020-Rezeptoren im Zytosol von Knochenmarkszellen

3. Ligandenspezifität der Gestagenbindungsstellen im Zytosol

Die Spezifität der R 5020-Bindungsstellen wurde mit Hilfe der Methode der kompetitiven Proteinbindung überprüft.

Dazu wurden die Proben mit nicht-markiertem R 5020 bzw. anderen Steroiden in Konzentrationen von 2 x 10^{-9} bis 1 x 10^{-6} mol/l und mit tritiiertem R 5020 (7 x 10^{-9} mol/l) inkubiert.
Die Proben zur Bestimmung der totalen Bindung enthielten nur 7 x 10^{-9} mol/l tritiiertes R 5020.



KOMPETITOR	KOMPETITION 50% [nMOL/L]
R1881	3,5
R5020	7,2
PROGESTERON	10,1
TESTOSTERON	10,1
DIHYDROTESTOSTERON	10,1
ALDOSTERON	NICHT ZU BESTIMMEN
DEXAMETHASON	
DIÄTHYLSTILBÖSTROL	

Abb.7: Hemmung der (^{3}H)-R 5020-Rezeptorbindung durch verschiedene Testhormone im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen

Abbildung 7 faßt eine repräsentative Kompetitionsstudie zusammen.

Bei der Beurteilung zeigt sich zunächst, daß sich das tritiierte R 5020 durch seinen spezifischen Kompetitor R 5020 nur mittelmäßig kompetieren ließ.

Ähnlich, aber etwas schwächer, kompetierten das natürliche Progesteron und die natürlichen Androgene (Dihydrotestosteron und Testosteron) die R 5020-Bindung.

Auffallend war die starke Kompetitionsfähigkeit des synthetischen Androgens (R 1881).
Diese übertraf bei weitem die des nicht-markierten R 5020 und läßt auf eine starke Konkurrenz um einen Rezeptor schließen, der für R 1881 eine höhere Affinität besitzt als für R 5020.

Alle übrigen Steroidhormone kompetierten nicht.

III. Charakterisierung des Androgen-Rezeptor-Komplexes

Zur Charakterisierung des Androgenrezeptors verwendete ich das synthetische Androgen, R 1881 (Methyltrienolon).

1. Affinität des R 1881 zum Rezeptor in intakten Zellen

Die scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) und die maximale Bindungskapazität (MBC) wurden mit der Methode von Scatchard bestimmt (vgl. Methodik II.2.2., Titrationsanalyse in intakten Zellen).

Für den Versuchsablauf wurden tritiiertes R 1881 in Konzentrationen von 0,2 - 3,6 x 10^{-9} mol/l und nicht-markiertes R 1881 (1 x 10^{-6} mol/l) verwendet.

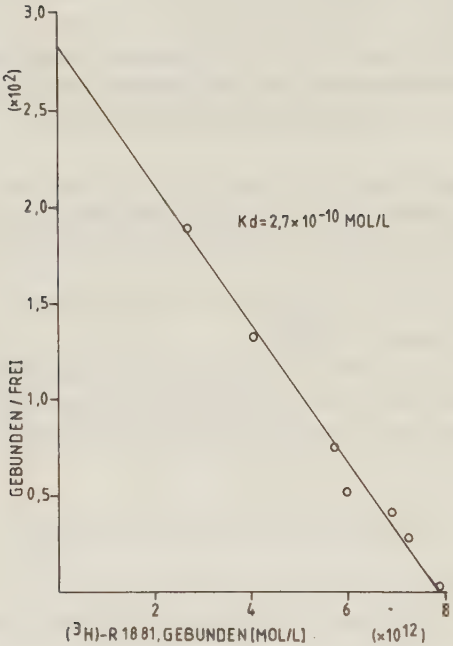


Abb.8: Scatchardanalyse der R 1881-Bindung in intakten Knochenmarkszellen

In Abbildung 8 ist ein repräsentativer Scatchard-Plot dargestellt (n = 8).

Für die Dissoziationskonstante ergab sich ein Wert von 3,8 ($\pm$ 1,6) x 10^{-10} mol/l; für die maximale Bindungskapazität ließ sich ein Wert von 0,8 ($\pm$ 0,4) fmol/mg Zellprotein errechnen.

Im Gegensatz zum Östrogen- und Gestagenrezeptor handelte es sich also um ein auch unter Ganzzellbedingungen erfaßbares Rezeptorprotein.

2. Affinität des R 1881 zum Zytosolrezeptor

Zusätzlich zum eindeutigen Rezeptornachweis in intakten Zellen wurde die Affinität des R 1881 zum Zytosolrezeptor überprüft.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) und der maximalen Bindungskapazität (MBC) war tritiiertes R 1881 im Konzentrationsbereich von 0,3 - 2,1 x 10^{-9} mol/l, sowie nicht-markiertes R 1881 (10^{-6} mol/l) erforderlich.

Der Versuchsablauf erfolgte analog zu dem Verfahren, das im Abschnitt Methoden II.2.3. schon beschrieben wurde.

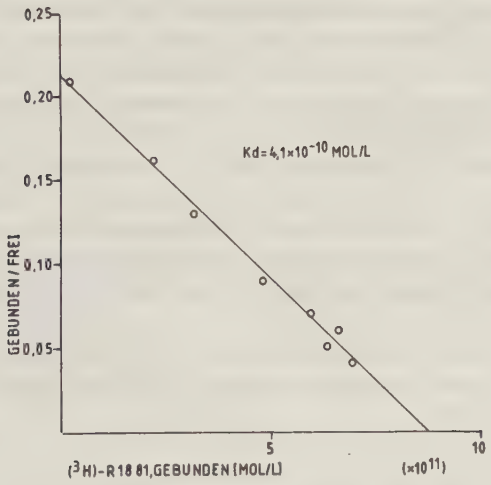


Abb.9: Ergebnis einer repräsentativen Scatchardanalyse für R 1881-Rezeptoren im Zytosol von Knochenmarkszellen

Der Scatchard-Plot zeigte - wie bei den ganzen Zellen - einen monophasischen Verlauf, aus dem sich eine Dissoziationskonstante von 3,9 ($\pm$ 0,55) x 10^{-10} mol/l (entsprechend der des Ganzzellassays) und eine maximale Bindungskapazität von 4 ($\pm$ 2,4) fmol/mg Zytosolprotein (0,8 fmol/mg Zellprotein beim Ganzzellassay) berechnen ließ.
Dies weist auf eine singuläre Klasse von Bindungsstellen hin.

3. Ligandenspezifität der Androgenbindungsstellen in intakten Zellen

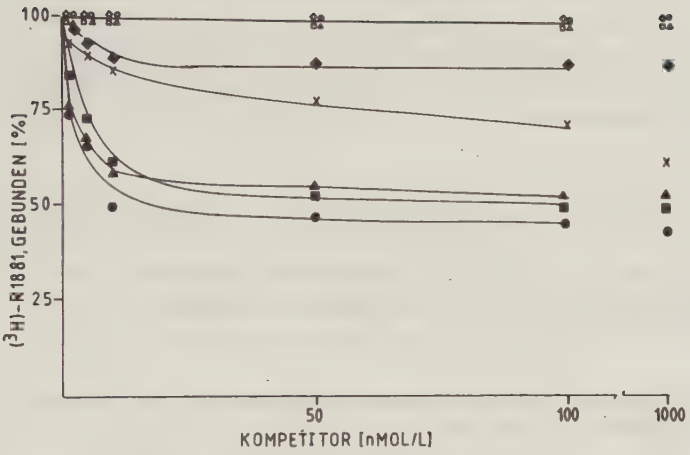
Zur Überprüfung der Ligandenspezifität der R 1881-Bindungsstellen wurde die Methode der kompetitiven Proteinbindung, diesmal in intakten Zellen, angewendet.

Hierzu wurde die aus Knochenmarkszellen gewonnene Zellsuspension (in Ansätzen von 2 ml) jeweils nur mit tritiiertem R 1881 (2,2 x 10^{-9} mol/l) zur Bestimmung der totalen Bindung oder zusammen mit nicht-markiertem R 1881 und anderen Steroiden in steigenden Konzentrationen (2 x 10^{-9} bis 1 x 10^{-6} mol/l) 30 Minuten bei 37°C im Schüttelbad inkubiert.

Die Stärke der Kompetitionsfähigkeit wurde durch die molare Konzentration des Testhormons charakterisiert, die 50% des tritiierten Hormons aus seiner Rezeptorbindung verdrängt.

Aus Abbildung 10 wird ersichtlich, daß eine Reihe von Testhormonen in der Lage war, R 1881 von seinem Rezeptor zu verdrängen.

Nach dem Ausmaß der Kompetitionsfähigkeit lassen sich in abnehmender Reihenfolge aufzählen:
- die natürlichen Androgene (Testosteron und Dihydrotestosteron), die in allen Konzentrationsbereichen nahezu gleich stark wie das synthetische Androgen (R 1881) kompetierten;
- das natürliche 17ß-Östradiol, welches das tritiierte



KOMPETITOR	KOMPETITION 50% [nMOL/L]
R 1881	2,2
TESTOSTERON	5,1
DIHYDROTESTOSTERON	2,7
ÖSTRADIOL	26,5
KORTIKOSTERON R 5020 PROGESTERON ALDOSTERON DIÄTHYLSTILBÖSTROL	NICHT ZU BESTIMMEN

Abb. 10: Hemmung der (^{3}H)-R 1881-Rezeptorbindung durch verschiedene Testhormone in intakten Knochenmarkszellen

R 1881 weniger stark als die Androgene, jedoch signifikant stärker als das synthetische Östrogen (Diäthylstilböstrol) von seiner Bindungsstelle verdrängte;
- das Kortikosteron (als Vertreter der Glukokortikoide), das nur eine geringe Kompetitionsfähigkeit aufwies.

Alle übrigen Steroide, wie das Mineralokortikoid (Aldosteron) und die Gestagene (Progesteron und R 5020), wirkten nicht kompetierend.

IV. Charakterisierung des Glukokortikoid-Rezeptor-Komplexes

Zur Charakterisierung des Glukokortikoidrezeptors wurde synthetisches (1,2-^{3}H)-Dexamethason verwendet.

1. Affinität des Dexamethasons zum Rezeptor in intakten Zellen

Zur Titrationsanalyse nach der Methode von Scatchard (vgl. Methoden II.2.2.) wurden tritiiertes Dexamethason im Konzentrationsbereich von 1,0 bis 7,0 x 10^{-9} mol/l und nicht-markiertes Dexamethason in einer Konzentration von 1 µmol/l eingesetzt.

Abbildung 11 zeigt den monophasischen Verlauf der Scatchard-analyse, aus dem auf eine einzige Kategorie spezifischer Dexamethasonbindungsstellen zu schließen ist.

Für die scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) ergab sich ein Wert von 8,5 ($\pm$ 0,63) x 10^{-10} mol/l.

Die maximale Bindungskapazität (MBC) betrug 24 ($\pm$ 11) fmol/mg Zellprotein ($\bar{x} \pm s_x$, n = 6).

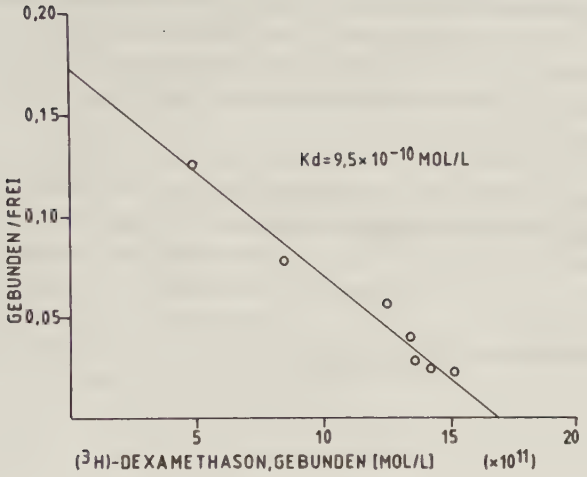


Abb.11: Repräsentative Scatchardanalyse der Dexamethasonbindung in intakten Knochenmarkszellen

2. Ligandenspezifität der Dexamethasonbindungsstellen in intakten Zellen

Der Versuchsablauf entsprach der Methode zur Überprüfung der Ligandenspezifität der Androgenbindungsstellen in intakten Zellen (vgl. III.3.).

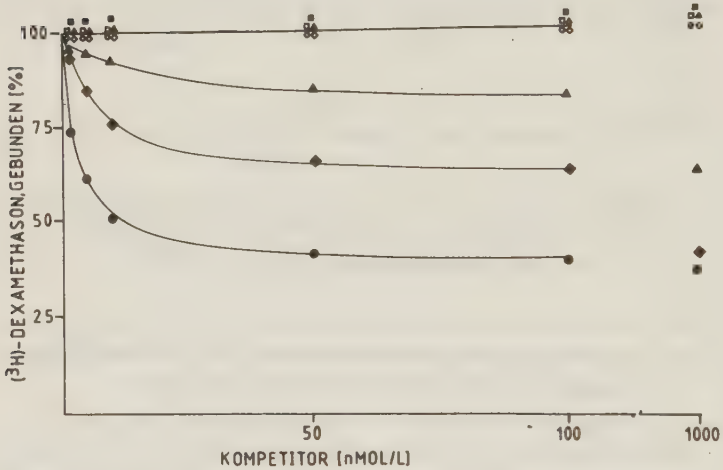
Das eingesetzte tritiierte Dexamethason lag mit 5,2 x 10^{-9} mol/l im Sättigungsbereich des Rezeptors.
Die Testhormone wurden, wie üblich, in einem Konzentrationsbereich von 2 x 10^{-9} bis 1 x 10^{-6} mol/l eingesetzt.

Abbildung 12 zeigt eine repräsentative Kompetitionsstudie (Anzahl der Versuche: 9).

In nennenswertem Umfang konkurrierten, außer Dexamethason

selbst, das natürliche Glukokortikoid (Kortisol) und - etwas schwächer ausgeprägt - das synthetische Androgen (R 1881) um die Bindungsstelle des (^{3}H)-Dexamethasons.

Die übrigen Testhormone wirkten nicht kompetierend.



KOMPETITOR	KOMPETITION 50% [nMOL/L]
DEXAMETHASON	5,2
KORTISOL	17,5
R 1881	NICHT ZU BESTIMMEN
ALDOSTERON	
TESTOSTERON	
DIHYDROTESTOSTERON	
PROGESTERON	
DIÄTHYLSTILBÖSTROL	

Abb.12: Hemmung der (^{3}H)-Dexamethason-Rezeptorbindung durch verschiedene Testhormone in intakten Knochenmarkszellen

V. Charakterisierung des Mineralokortikoid-Rezeptor--Komplexes

1. Affinität des Aldosterons zum Rezeptor in intakten Zellen

In der Titrationsanalyse wurde (^{3}H)-Aldosteron im Konzentrationsbereich von 0,15 bis 2,00 x 10^{-9} mol/l eingesetzt. Parallelansätze für die Bestimmung der unspezifischen Bindung enthielten zusätzlich 1 x 10^{-6} mol/l nicht-markiertes Aldosteron als Kompetitor.

Die weitere Aufarbeitung und anschließende Auswertung erfolgten wieder nach der Methode von Scatchard.

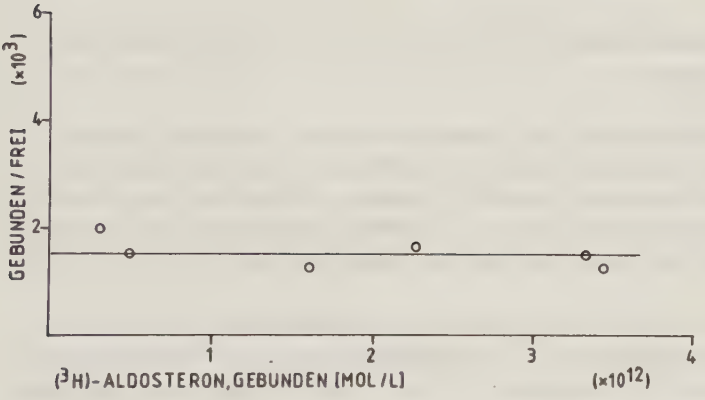


Abb.13: Scatchardanalyse der Aldosteronbindung in intakten Knochenmarkszellen

Der horizontal verlaufende Scatchard-Plot in Abbildung 13 läßt darauf schließen, daß unter den Versuchsbedingungen des Ganzzellassays lediglich unspezifische, nicht-sättigbare Bindung zu erfassen war.

2. Affinität des Aldosterons zum Zytosolrezeptor

Zur Charakterisierung des Aldosteronrezeptors, der wegen seiner bekannten Labilität mit der üblichen Methode, die bei der Titrationsanalyse der Östrogen-, Androgen- und Gestagenrezeptoren im Zytosol schon angewendet worden war, nicht erfaßt werden konnte, wurde bereits das Homogenat (300 µl) nur mit tritiiertem Aldosteron (0,5 - 3,8 x 10^{-9} mol/l) oder zusätzlich mit nicht-markiertem Aldosteron versetzt.
Erst danach wurde das Zytosol aus dem Homogenat durch Zentrifugation in einer mit Pressluft betriebenen Ultrazentrifuge hergestellt und der Überstand (= schon mit Hormon beladenes Zytosol) 2 Stunden bei 0 - 3°C inkubiert.

Das freie Hormon wurde anschließend mit Hilfe der Dextrankohle-Methode entfernt.

Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach der Methode von Scatchard.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aller in dieser Arbeit bisher durchgeführten Rezeptorstudien mit den verschiedenen Hormonen (sowohl in intakten Zellen als auch in Zytosolen) können die in Abbildung 14 aufgetragenen Punkte nicht zu einer Geraden verbunden werden.

Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muß die schon erwähnte Labilität des Aldosteronrezeptors berücksichtigt werden, die besonders bei niedrigen Hormonkonzentrationen sehr ausgeprägt ist.
Der Rezeptor wird nämlich durch die Bindung des Hormons vor seinem Abbau geschützt, so daß seine Labilität dementsprechend bei niedrigen Hormonkonzentrationen größer ist als bei hohen Hormonkonzentrationen, da dann alle Rezeptoren mit Hormon besetzt sind.
Es werden somit im ersten Teil (bei niedrigen Hormonkonzentrationen) der Titrationsanalyse fälschlich zu niedrige Hormonrezeptorkonzentrationen gefunden.

Eine Dissoziationskonstante kann demnach nur im zweiten Teil (bei höheren Hormonkonzentrationen) der Titrationsanalyse abgeschätzt werden, da hier der Aldosteronrezeptor die größte Stabilität besitzt.
Es ließ sich in diesem Bereich eine Dissoziationskonstante (K_d) von 2,6 x 10^{-10} mol/l bestimmen.

Die maximale Hormonbindungskapazität (MBC) betrug 0,13 fmol/mg Zytosolprotein.

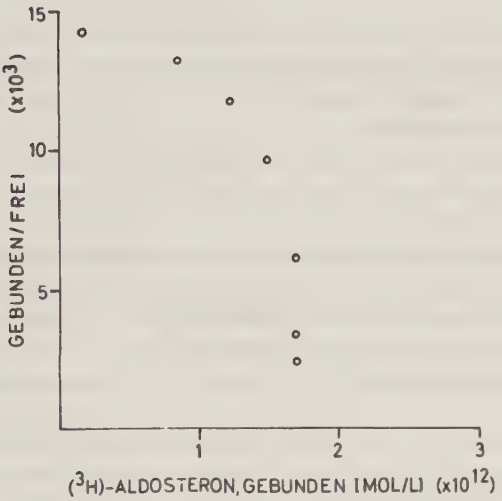


Abb.14: Ergebnis einer typischen Scatchardanalyse für Aldosteronrezeptoren im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen

DISKUSSION

Zur Charakterisierung der Rezeptorbindung der Steroidhormone (Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide) im Knochenmark war zunächst eine Isolierungsmethode erforderlich, mit der die Zellen des Knochenmarks intakt und in großer Ausbeute gewonnen werden konnten.

Dieses Problem ließ sich nach direkter Gewinnung des Knochenmarks aus Tibia und Femur des Chinchilla-Kaninchens durch ein mechanisches Suspendierungsverfahren lösen, da die Zellen nur in sehr lockeren Zellverbänden vorlagen.

Die Titration der Rezeptoren und die Auswertung nach Scatchard wurden sowohl im Zytosol - eine schon seit mehr als 10 Jahren bekannte Methode (Jensen et al., 1968) - als auch in intakten Zellen vorgenommen.

Die Verwendung von intakten Zellen hat gegenüber dem Zytosol folgende Vorteile:

- Vorhandensein eines physiologischen Rezeptormilieus;
- Erfassung der sich im Kern befindenden Rezeptoren;
- Erfassung der von endogenen Hormonen besetzten Rezeptoren unter Exchange-Bedingungen (37°C)

(McGuire et al., 1977).

Im weiteren Teil der Diskussion werde ich nun auf die in meinen Rezeptorstudien an Knochenmarkszellen ermittelten Eigenschaften der verschiedenen Steroidhormon-bindenden Makromoleküle näher eingehen.

Charakterisierung des Östrogenrezeptors

Die Scatchardanalysen in intakten Zellen nahmen einen horizontalen Verlauf, der als Hinweis auf eine nicht-sättigbare Bin-

dung interpretiert werden kann, während entsprechende Versuche im Zytosol das Vorhandensein eines spezifischen Östrogenrezeptors bewiesen.

Mit Hilfe der Dextrankohle-Methode ließ sich die scheinbare Dissoziationskonstante der 17β-Östradiol-Rezeptor-Komplexe (K_d = 2,3 ± 0,41 x 10^{-10} mol/l) im Zytosol der Knochenmarkszellen bestimmen.
Ähnliche Werte werden von anderen Arbeitsgruppen für verschiedene Zielorgane, wie das Mammagewebe der Ratte (K_d = 8 x 10^{-10} mol/l, Wittliff et al., 1972) und weitere Zielorgane (K_d im 10^{-10} mol/l-Bereich, Hähnel, 1971; Sanborn et al., 1971; King und Mainwaring, 1974), angegeben.

Die maximale Östrogenrezeptorkonzentration, die im Knochenmark gefunden wurde, erreichte einen Wert von 8,2 ± 4,1 fmol/mg Zytosolprotein.
Dieser Wert liegt niedriger als die von anderen Arbeitsgruppen für bereits bekannte Zielorgane (Uterus, Ovar, Mammagewebe) unterschiedlicher Spezies und für das Mammakarzinom des Menschen ermittelten Daten.
Die maximalen Bindungskapazitäten bewegen sich hier hauptsächlich im Bereich von 10 - 1000 fmol/mg Zytosolprotein (King und Mainwaring, 1974; McGuire et al., 1975).
Die Ursachen dürften in den zur Ermittlung der Ergebnisse angewandten unterschiedlichen Methoden und in der Tatsache zu suchen sein, daß nur bestimmte Subpopulationen der Knochenmarkszellen für Östrogene empfänglich sind.

Die Darstellbarkeit des Östrogenrezeptors im Zytosol, nicht jedoch in intakten Zellen könnte mit dem Steroidtransport durch die Zytoplasmamembran zusammenhängen.
Zwar wird von den meisten Untersuchungsgruppen (z.B. Williams und Gorski, 1971) angenommen, daß die Zellmembran keine Barriere für die freie Diffusion der Östrogene darstellt, doch ist zur Zeit noch immer ungeklärt, ob nicht doch ein molekularer Transportmechanismus in der Zellmembran existiert, der unter bestimmten Versuchsbedingungen die Rezeptortitration stören könnte (Jensen und Jacobson, 1960; King und Mainwaring, 1974;

Rao et al., 1976; Träger, 1977).
Eine Schädigung bzw. Zerstörung des Östrogenrezeptors durch die gewählte Temperatur ist sehr unwahrscheinlich, da die Versuchsbedingungen des Ganzzellassays (37°C) denen des physiologischen Milieus entsprechen.
Im Zytosol dagegen würde diese Temperatur die Aktivität der durch die Herstellung des Zytosols freigesetzten lysosomalen Enzyme steigern und dadurch den Rezeptor zerstören (Peck et al., 1973).

Die Bindungsstudien im Zytosol zeigten eine ausgeprägte Spezifität der 17ß-Östradiol-bindenden, zytosolischen Makromoleküle für Östrogene.
Bei allen untersuchten Zytosolen wurde festgestellt, daß die Bindungsfähigkeit des Rezeptors für verschiedene Östrogene in folgender Reihenfolge abnimmt: Östradiol - Östron - Östriol - Diäthylstilböstrol.
Dieses Ergebnis entspricht den Bindungsstudien von Martucci und Fishman (1976) an Uterusrezeptoren.

Die Tatsache, daß Aldosteron, Glukokortikoide und Gestagene nicht mit 17ß-Östradiol um die Bindungsstellen konkurrierten, beweist, daß der vorliegende Rezeptor keine Affinität zu den oben genannten Hormonen besitzt.

Eine schwache Kreuzreaktion von 17ß-Östradiol zu einem Androgenrezeptor, wie er im Zytosol von Mäuse- (Drews et al., 1972) und Rattenniere (Rafestin-Oblin et al., 1975) nachgewiesen worden war, konnte nicht ausgeschlossen werden.
Zwar zeigten Testosteron und Dihydrotestosteron keine Konkurrenz mit 17ß-Östradiol um die Bindungsplätze, doch war das synthetische Androgen (R 1881), wenn auch nur in geringem Maße, in der Lage, das Hormon aus seiner Rezeptorbindung zu verdrängen.
Die Beobachtung, daß die Östrogenrezeptorbindung sich nicht durch Testosteron kompetieren ließ, schließt aus, daß es sich bei diesen Bindern um Sexualhormon-bindendes Globulin handelt, von dem bekannt ist, daß es Testosteron und Östradiol an glei-

cher Bindungsstelle fixiert, wobei jedoch Testosteron eine höhere Affinität zu diesem unspezifischen Plasmabinder entwickelt (Westphal, 1971).

Wie schon andere Arbeitsgruppen (King und Mainwaring, 1974; Wittliff, 1974; McGuire et al., 1975) bei Überprüfung des Sedimentationsverhaltens 17ß-Östradiol-beladener, zytosolischer Östrogenrezeptoren auf linearen Saccharosegradienten nachgewiesen haben, zeigte sich in der 8S-Region ein deutliches Radioaktivitätsmaximum, das als ein typisches Zeichen für das Vorliegen eines echten Östrogenrezeptors interpretiert werden kann (McGuire et al., 1975).
Andererseits sedimentierte auch ein kleiner Teil der 17ß--Östradiol-Rezeptor-Komplexe in der 4S-Region, wie es schon seit längerem von monomeren Steroidhormonrezeptoren bekannt ist (Little et al., 1973).

Charakterisierung des Gestagenrezeptors

Um die Frage nach dem Vorhandensein eines Gestagenrezeptors in den Knochenmarkszellen des Kaninchens zu beantworten, verwendete ich das synthetische Gestagen R 5020, das im Gegensatz zum Progesteron keine Affinität zum Transkortin aufweist (Horwitz und McGuire, 1975).

Bindungsstudien in intakten Zellen zeigten - wie die Bindungsstudien von (^{3}H)-Östradiol-Rezeptoren in intakten Zellen - lediglich eine unspezifische, nicht-sättigbare Bindung.
Die möglichen Erklärungen entsprechen den Ausführungen zum Östrogenrezeptor.

Im Zytosol ließ sich jedoch nach der Methode von Scatchard eine R 5020-Bindungskomponente feststellen, die durch eine scheinbare Dissoziationskonstante K_d von 1×10^{-9} mol/l charakterisiert war.
Dieser Wert ist mit den Ergebnissen vergleichbar, die durch Versuche an Hühnereileitern ($K_d = 1 \times 10^{-9}$ mol/l, Kuhn, 1975)

und am Uterus von Kaninchen (K_d = 0,7 x 10^{-9} mol/l, McGuire et al., 1977) gewonnen wurden.

Die maximale Bindungskapazität für R 5020 im Zytosol betrug etwa 4,8 fmol/mg Zytosolprotein.
Ergebnisse anderer Untersuchungsgruppen an Zielorganen unterschiedlicher Spezies liegen bei verschiedenen Methoden zwischen 0,5 und 70 fmol/mg Zytosolprotein und damit ungefähr in der gleichen Größenordnung (McGuire et al., 1975; Kuhn et al., 1975).

Untersuchungen zur Ligandenspezifität der (^{3}H)-R 5020-Bindungsstellen im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen zeigten, daß sowohl Progesteron als auch die natürlichen Androgene (Testosteron und Dihydrotestosteron) mit (^{3}H)-R 5020 um die Bindungsstelle konkurrierten, während R 1881, ein synthetisches Androgen, alle genannten Hormone hinsichtlich seiner Affinität zum R 5020-Rezeptor bei weitem übertraf.
Die Konkurrenz der Gestagene und Androgene um eine Bindungsstelle wirft die Frage auf, ob R 5020 an einen spezifischen Progesteronrezeptor oder möglicherweise an einen Androgenrezeptor gebunden wird.
Diese Frage läßt sich hier nur soweit beantworten, als daß die Gestagene (Progesteron und R 5020), wie spätere Versuche gezeigt haben, keine Affinität zum Androgenrezeptor zeigen. Daraus folgt, daß Androgene in der Lage sind, R 5020 von seiner Bindungsstelle zu verdrängen, sich ihrerseits aber nicht von den Gestagenen kompetieren lassen.
Diese Tatsache läßt vermuten, daß neben einem spezifischen Androgenrezeptor, der sich nicht durch Gestagene kompetieren läßt, ein Progesteron- bzw. ein atypischer Androgenrezeptor existiert, der eine etwa gleich starke Affinität zu R 5020, Progesteron, Testosteron und Dihydrotestosteron besitzt und durch eine besonders hohe Affinität zu R 1881 charakterisiert ist.
Diese Vermutung wird durch den Vergleich der scheinbaren Dissoziationskonstanten für die Androgenrezeptorbindung (K_d = 3,9 x 10^{-10} mol/l) - in die nach obiger Hypothese auch die

Bindung an den diskutierten Rezeptor miteingehen würde - mit der scheinbaren Dissoziationskonstanten für die Gestagenrezeptorbindung (K_d = 1 x 10^{-9} mol/l) bestätigt. Andere Arbeitsgruppen, wie McGuire et al. (1975) und Asselin et al. (1976), stellten ebenfalls in unterschiedlichen Geweben (Mamma-Ca, benigne Prostata-Hypertrophie) eine Kreuzreaktion zwischen Androgenen und einem Progesteronrezeptor fest, kamen jedoch zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen:

- McGuire et al. (1975) nahmen die Existenz eines Rezeptors an, der sowohl Androgene als auch Gestagene bindet, da sie auch umgekehrt eine Kreuzreaktion von Gestagenen mit dem Rezeptor fanden;
- Asselin et al. (1976) stellten die Hypothese auf, daß sowohl spezifische Androgen- als auch spezifische Progesteronrezeptoren existieren, Androgene aber, und insbesondere R 1881, eine Affinität zu beiden Rezeptoren besitzen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Interaktion von Androgenen und Gestagenen mit dem gleichen Binder wäre die Annahme eines noch nicht näher bekannten Plasmaproteins mit einer relativ hohen Affinität zu Progesteron (analog dem von Stroupe et al. (1975) im Meerschweinchenplasma entdecktem Glykoprotein mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten von 1 x 10^{-9} mol/l für Progesteron), das gleichzeitig auch Androgene bindet.

Die Beobachtung, daß sich R 5020 nicht durch Östrogene verdrängen ließ, schließt aus, daß es sich bei dem vorliegenden Rezeptor um Orosomukoid handelt, das eine besondere Affinität zu dem synthetischen Gestagen zeigt (Uniyal und Laumas, 1976), jedoch auch Östrogene und Androgene bindet.

Erwartungsgemäß fand ebenfalls keine Kompetition durch Dexamethason (als Vertreter der Glukokortikoide) statt (McGuire et al., 1975).

Charakterisierung des Androgenrezeptors

Zur Identifizierung des Androgenrezeptors verwendete ich Methyltrienolon (R 1881), da dieses synthetische Androgen keine Interaktion mit dem Sexualhormon-bindenden Globulin (SBG) eingeht, das sowohl Testosteron als auch Dihydrotestosteron mit hoher Affinität bindet (Davies und Griffiths, 1975).
Ein weiterer Grund für die von mir bevorzugte Verwendung des synthetisches Androgens ist die fehlende Metabolisierung des R 1881 während der Inkubation im Vergleich zu den natürlichen Androgenen (Bonne und Raynaud, 1975; Tremblay et al., 1977).

Im Gegensatz zu Bindungsstudien mit weiblichen Sexualhormonen (Östrogene und Gestagene) ließ sich nach der Methode von Scatchard sowohl in intakten Zellen als auch im Zytosol isolierter Knochenmarkszellen eine Bindungskomponente für R 1881 feststellen.

Mit der Bestimmung der Rezeptoren in intakten Zellen war es gelungen, gleichzeitig die spezifischen Bindungsproteine des Kerns und des Zytosols zu erfassen.

Für den R 1881-Rezeptor-Komplex in intakten Zellen ermittelte ich eine scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) von 3,8 ($\pm$ 1,6) x 10^{-10} mol/l, für den R 1881-Rezeptor-Komplex im Zytosol einen entsprechenden Wert von 3,9 ($\pm$ 0,55) x 10^{-10} mol/l.
Daraus ist zu folgern, daß in intakten Zellen und im Zytosol Rezeptoren gleicher Affinität zu R 1881 erfaßt wurden.
Dies entspricht den theoretischen Erwartungen des Ganzzellassays.
Ähnliche Werte werden von anderen Arbeitsgruppen für verschiedene Organe, wie Rattenmuskeln (K_d = 9,4 x 10^{-10} mol/l, Tremblay et al., 1977) und Prostata der Ratten (K_d = 6 x 10^{-10} mol/l, Bonne und Raynaud, 1976) angegeben.
Diese Untersuchungen fanden jedoch immer im Zytosol der jeweiligen Gewebe statt.

Die R 1881-Rezeptorkonzentration erreichte in intakten Zellen einen Wert von 0,8 (± 0,4) fmol/mg Zellprotein, im Zytosol einen Wert von 4,0 (± 2,4) fmol/mg Zytosolprotein.
Die höhere Bindungskapazität im Zytosol (im Vergleich zu der maximalen Bindungskapazität in intakten Zellen) dürfte darauf zurückzuführen sein, daß durch die Herstellung des Zytosolproteins ein großer Teil der Nicht-Rezeptor-Bestandteile, d.h. hochmolekulare Proteine, wie z.B. Membranproteine, entfernt werden und nicht mehr in die Berechnung miteingehen.
Tremblay et al. (1977) fanden im Zytosol des Levator ani und des Musculus bulbo-cavernosus von Ratten eine R 1881-Bindungskapazität von 11,7 fmol/mg Zytosolprotein.
Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Bonne und Raynaud, 1976; Ghanadian et al., 1978), die durch Versuche im Zytosol von Prostatagewebe der Ratte und des Menschen ermittelt wurden, liegen höher als der im Knochenmark gefundene Wert.
Diese Unterschiede dürften jedoch auf den verschieden angewandten Methoden und auf der Tatsache beruhen, daß das Knochenmark weit weniger als Prostata und Muskel als Zielorgan für Androgene angesehen werden kann.

Die Überprüfung der Ligandenspezifität der R 1881-bindenden Makromoleküle in der intakten Zelle wies auf einen sehr spezifischen Androgenrezeptor hin.
Lediglich die natürlichen Androgene (Testosteron und Dihydrotestosteron) wirkten neben R 1881 kompetierend.

Interessanterweise stellten sich Progesteron und R 5020 nicht als Konkurrenten um die R 1881-Bindungsstelle heraus, obwohl R 1881 selbst eine starke Affinität zum R 5020-bindenden Rezeptor gezeigt hatte.
Dieses Verhalten wurde ebenfalls von Bonne und Raynaud (1976) und Asselin et al. (1976) an der Prostata der Ratte im Zytosol nachgewiesen, während entsprechende Versuche an benignen Prostataadenomen des Menschen eine starke Kompetitionsfähigkeit beider Gestagene gezeigt hatten (Asselin et al., 1976; Ghanadian et al., 1978).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Asselin et al., 1976; Bonne und Raynaud, 1976) an Prostatageweben der Ratten, die keinen Hinweis auf eine Affinität der Östrogene zum zytosolischen Androgenrezeptor zeigten, konkurrierte 17ß-Östradiol in intakten Knochenmarkszellen, wenn auch nur in geringem Maße, mit R 1881 um die Bindungsplätze.
Es liegt somit eine Kreuzreaktion zwischen Östrogenen und dem Androgenrezeptor vor, wie sie auch schon im Zytosol der Mäuse- (Drews et al., 1972) und der Rattenniere (Rafestin-Oblin et al., 1975) nachgewiesen worden ist.
Dieser Reaktion entspricht auch umgekehrt eine Kompetitionsfähigkeit von R 1881 (in höheren Konzentrationen) gegenüber dem Östrogenrezeptor, wie ich sie oben schon beschrieben habe.

Das synthetische Östrogen (Diäthylstilböstrol) zeigte dagegen keine Reaktion mit der R 1881-Bindungsstelle.

Als Vertreter der Glukokortikoide erwies sich Kortikosteron als schwächster, aber dennoch signifikanter Konkurrent um den R 1881-Rezeptor, während das Mineralokortikoid (Aldosteron) keinen kompetierenden Effekt auf die Bindung ausübte. Dieses Verhalten wird nicht von allen Untersuchungsgruppen bestätigt.
So fanden Bonne und Raynaud (1976) keine Interaktion zwischen Glukokortikoiden und Androgenen bei Untersuchungen der zytosolischen Androgenrezeptoren in Prostatageweben der Ratte, während Bojar et al.(1980a) eine so starke Bindung von Androgenen an den Glukokortikoidrezeptor fanden, daß sie zur Untersuchung des Androgenrezeptors das Zytosol mit Triamcinolonacetat präinkubierten, um eine Bindung des R 1881 an den Glukokortikoidrezeptor zu verhindern.

Charakterisierung des Glukokortikoidrezeptors

Mit der Methode von Scatchard ließ sich schon bei Untersu-

chungen an intakten Zellen des Knochenmarks die Frage nach der Existenz eines Glukokortikoidrezeptors beantworten.

Es konnte eine Dexamethasonbindungskomponente mit einer scheinbaren Dissoziationskonstanten von 8,5 ($\pm$ 0,63) x 10^{-10} mol/l und einer maximalen Bindungskapazität von 24 ($\pm$ 1,1) fmol/mg Zellprotein identifiziert werden.
Andere Arbeitsgruppen, die hauptsächlich Leberzytosole unterschiedlicher Spezies untersuchten, fanden scheinbare Dissoziationskonstanten, die von 0,4 bis 2,5 x 10^{-8} mol/l reichten (Baxter und Tomkins, 1971; Beato und Feigelson, 1972; Defer et al., 1974).
Bei Untersuchungen der zytosolischen Dexamethasonbindung in der fötalen Kaninchenniere und in der Rattenniere ermittelten Giannopoulos et al. (1974) und Funder et al. (1973) K_d-Werte von 3,1 x 10^{-9} mol/l bzw. 5,0 x 10^{-9} mol/l.
Die höhere Affinität der Dexamethasonbindungskomponenten in intakten Knochenmarkszellen könnte vor allem darauf zurückgeführt werden, daß sich der Rezeptor in seinem optimalen, physiologischen Milieu befindet.

Ein Vergleich der in intakten Knochenmarkszellen ermittelten maximalen Bindungskapazität mit den Werten, die von anderen Arbeitsgruppen durch Versuche an Zytosolen verschiedener Gewebe erstellt wurden, zeigt, daß sich alle gefundenen Werte im Bereich einer Größenordnung bewegen trotz unterschiedlicher Methoden, die zur Gewinnung der Daten angewendet wurden.
Die maximale Hormonrezeptorkonzentration wird für das Mamma- und Uterusgewebe bis zu 70 fmol/mg Zytosolprotein (Feherty et al., 1971; Wittliff et al., 1971; Wittliff et al., 1972; Jensen und deSombre, 1972), für Lebergewebe bis zu 67,5 fmol/mg Zytosolprotein (Bojar et al., 1980b) und für das Nierenzytosol des Kaninchens mit 50 fmol/mg Zytosolprotein (Giannopoulos et al., 1974) angegeben.

Die Untersuchungen zur Ligandenspezifität der Dexamethasonbindungsstellen in intakten Zellen zeigten, daß vor allem Kortisol mit Dexamethason um die Bindungsstelle zu konkurrieren vermag.

Die geringere Kompetitionsfähigkeit des Kortisols, verglichen mit Dexamethason, stimmt mit der Beobachtung überein, daß Kortisol unter physiologischen und experimentellen Bedingungen eine etwa 10 - 15 mal geringere Aktivität als Dexamethason zeigt (Munck und Leung, 1977).

Die Tatsache, daß sich Dexamethason weder von Aldosteron noch von den Sexualhormonen (Testosteron, Dihydrotestosteron, Progesteron und Diäthylstilböstrol) aus seiner Rezeptorbindung verdrängen ließ, kann als weiterer Hinweis für die hohe Spezifität der Bindungsstelle interpretiert werden.

Lediglich das synthetische Androgen (R 1881) zeigte, wenn auch nur in geringem Maße, eine gewisse Konkurrenzfähigkeit zu dem Dexamethason.
Dementsprechend war auch umgekehrt eine geringe Kreuzreaktion der Glukokortikoide mit dem Androgenrezeptor festgestellt worden.

Charakterisierung des Mineralokortikoidrezeptors

Bindungsstudien in intakten Zellen lieferten, wie entsprechende Studien zur Charakterisierung der Gestagen- und der Östrogen-bindenden Komponenten, Hinweise auf eine unspezifische, nicht-sättigbare Bindung.

Im Zytosol zeichnete sich dagegen eine sehr schnell sättigbare Bindungskomponente ab.
Wegen der ausgeprägten Labilität des Rezeptors, insbesondere in niedrigen Hormonkonzentrationsbereichen, ließ sich nur annähernd eine scheinbare Dissoziationskonstante (K_d) von $2{,}6\ (\pm\ 0{,}4) \times 10^{-10}$ mol/l abschätzen.
Die maximale Bindungskapazität betrug lediglich 0,13 fmol/mg Zytosolprotein.

Funder et al. (1972) fanden für Aldosteron im Rattennierenzytosol zwei spezifische Binder mit einer K_d von 2×10^{-10}

mol/l und 0,25 x 10^{-8} mol/l.
Der Binder mit der höheren Affinität entspricht anscheinend dem im Knochenmark gefundenen.

Zum Abschluß meiner Arbeit möchte ich die in der Einleitung gestellte Frage beantworten, ob die klinisch bekannten Effekte der Steroidhormone auf die Zellen des Blutes und entsprechende Vorstufen im Knochenmark (neben einer indirekten Beeinflussung des Knochenmarks über weitere regulatorische Größen) auch auf direkte Interaktionen der Hormone mit Rezeptoren des Knochenmarks zurückgeführt werden können.

Nach den Ergebnissen meiner Rezeptorstudien besitzt das Knochenmark hormonspezifische Bindungsproteine für fast alle in dieser Arbeit verwendeten Steroidhormone (Östrogene, Gestagene, Androgene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide).
Dabei korreliert die Höhe der maximalen Bindungskapazität in etwa mit dem Ausmaß der klinischen Wirkung des jeweiligen Steroidhormons.

So entspricht einer ausgeprägten klinischen Glukokortikoidwirkung auf fast alle Subpopulationen der Blut- bzw. Knochenmarkszellen ein in meinen Versuchen nachgewiesener Glukokortikoidrezeptor mit einer hohen maximalen Bindungskapazität von 24 fmol/mg Zellprotein.

Androgene und Östrogene beeinflussen klinisch hauptsächlich eine Subpopulation, die Erythrozyten bzw. die Thrombozyten.
Die jeweils nachgewiesenen Rezeptoren besitzen dementsprechend eine (im Vergleich zum Glukokortikoidrezeptor) geringere maximale Bindungskapazität (MBC für den Androgenrezeptor = 4,0 fmol/mg Zytosolprotein; MBC für den Östrogenrezeptor = 8,2 fmol/mg Zytosolprotein).

Die Wirkung der Gestagene und Mineralokortikoide ist klinisch nicht gesichert.
Dies stimmt nur zum Teil mit den Ergebnissen meiner Rezeptor-

studien überein: der gefundene Gestagenrezeptor zeigte eine maximale Bindungskapazität (MBC = 4,8 fmol/mg Zytosolprotein), die trotz der klinisch nicht objektivierbaren Wirkung des Gestagens in dem gleichen Größenbereich wie auch die maximalen Bindungskapazitäten der Androgen- und Östrogenrezeptoren lag; der Aldosteronrezeptor dagegen besaß erwartungsgemäß nur eine sehr geringe maximale Bindungskapazität von 0,13 fmol/mg Zytosolprotein.

LITERATURVERZEICHNIS

Asselin, J., Labrie, F., Gourdeau, Y., Bonne, C. & Raynaud, J.P. (1976)
Steroids 28, 449

Bargmann, W. (1967)
in: Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen 6, 293 (Bargmann, W., Hrsg.) Thieme Verlag, Stuttgart

Baxter, J.D. & Tomkins, G.M. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 932

Beato, M. & Feigelson, P. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7890

Bojar, H., Staib, W., Beck, K. & Pilaski, J. (1980a)
Cancer 46, 12

Bojar, H., Westerkamp, S., Staib, W. & Broelsch, Ch. (1980b)
Hepato-Gastroenterology 27, 176

Bonne, C. & Raynaud, J.P. (1975)
Steroids 26, 227

Bonne, C. & Raynaud, J.P. (1976)
Steroids 27, 497

Davies, P. & Griffiths, K. (1975)
Mol. Cell. Endocrinol. 3, 143

Defer, N., Dastugue, B., Kruh, J., Befort, J.J., Beck, G. & Beck, J.P. (1974)
FEBS Letters 45, 179

Drews, U., Itakura, H., Dofuku, R., Tettenborn, U. & Ohno, S. (1972)
Nature [New Biol.] 238, 216

Feherty, P., Farrer-Brown, G. & Kellie, A.E. (1971)
Brit. J. Cancer 25, 697

Frey-Wettstein, M. & Craddock, C.G. (1970)
Schweiz. Med. Wschr. 100, 1984

Funder, J.W., Feldman, D. & Edelman, I.S. (1972)
J. Steroid Biochem. 3, 209

Funder, J.W., Feldman, D. & Edelman, I.S. (1973)
Endocrinology 92, 1005

Ghanadian, R., Auf, G., Chaloner, P.J. & Chisholm, G.D. (1978)
J. Steroid Biochem. 9, 325

Giannopoulos, G., Hassan, Z. & Solomon, S. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 2424

Gordon, A.S. (1954)
Recent Progr. Hormone Res. 10, 339

Hähnel, R. (1971)
Steroids 17, 105

Hechter, O. & Halkerston, J.D.K. (1964)
Hormones 5, 697

Horwitz, K.B. & McGuire, W.L. (1975)
Steroids 25, 497

Inman, W.H., Vessey, M.P., Westerholm, B. & Engelund, A. (1970)
Brit. Med. J. 2, 203

Jensen, E.V. & Jacobson, H.I. (1960)
in: Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer 1, 161
(Pincus, G. & Vollmer, E.P., Hrsg.) Academic Press, New York

Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W. & DeSombre, E.R. (1968)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 632

Jensen, E.V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S. & DeSombre, E.R. (1969)
Steroids 13, 417

Jensen, E.V. & DeSombre, E.R. (1972)
Ann. Rev. Biochem. 41, 203

Jungblut, P.W., Hätzel, I., DeSombre, E.R. & Jensen, E.V. (1967)
in: Wirkungsmechanismen der Hormone 1, 58
(Karlson, P., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Kennedy, B.J. (1962)
Ann. Intern. Med. 57, 917

King, R.J.B. & Mainwaring, W.I.P. (1974)
in: Steroid-Cell Interactions 1, 1
(King, R.J.B. & Mainwaring, W.I.P., Hrsg.) Butterworth, London

Korenman, S.G. & Rao, B.R. (1968)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1028

Kuhn, R.W., Schrader, W.T., Smith, R.G. & O'Malley, B.W. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4220

Lennert, K. (1975)
in: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie 29, 353
(Eder, M. & Gedigk, P., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Little, M., Szendro, P.J. & Jungblut, P.W. (1973)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 354, 1599

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265

Martin, A.N., Swarbrick, J. & Cammarata, A. (1975)
in: Physikalische Pharmazie 1, 1
(Ehrhardt, L., Hrsg.) Wissenschaftliche Verlagsanstalt, Stuttgart

Martin, R.G. & Ames, B.N. (1961)
J. Biol. Chem. 236, 1372

Martucci, C. & Fishman, J. (1976)
Steroids 27, 325

McGuire, W.L., Pearson, O.H. & Segaloff, A. (1975)
in: Estrogen Receptors in Human Breast Cancer 1, 17
(McGuire, W.L., Carbone, P.P. & Vollmer, E.P., Hrsg.)
Raven Press, New York

McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Pearson, O.H. & Segaloff, A. (1977)
Cancer 39, 2934

Munck, A. & Leung, K. (1977)
in: Receptors and Mechanisms of Action of Steroid Hormones
Modern Pharmacology-Toxicology 8, 311
(Pasqualini, J.R., Hrsg.) Marcel Dekker, New York Basel

Peck, E.J., DeLibero, J., Richards, R. & Clark, J.H. (1973)
Biochemistry 12, 4603

Rafestin-Oblin, M.E., Michan, A. & Corvol, P. (1975)
10th FEBS-Meeting, Kongressbuch 1376

Rao, G.S., Schulze-Hagen, K., Rao, M.L. & Breuer, H. (1976)
J. Steroid Biochem. 7, 1123

Richterich, R. (1971)
in: Klinische Chemie 3, 305

Romani, J.D. (1952)
Compt. rend. soc. biol. 146, 1565

Sanborn, B.M., Rao, B.R. & Korenman, S.G. (1971)
Biochemistry 10, 4955

Scatchard, G. (1949)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660

Shahidi, N.T. (1973)
N. Engl. J. Med. 289, 72

Stamm, H. (1975)
Therapie der Gegenwart 114, 1231

Stroupe, S.D., Cheng, S.L. & Westphal, U. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 168, 473

Toft, D. & Gorski, J. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 1574

Träger, L. (1977)
in: Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung 1, 1
(Träger, L., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Tremblay, R.R., Dube, J.Y., Ho-Kim, M.A. & Lesage, R. (1977)
Steroids 29, 185

Turnell, R.W. & Burton, A.F. (1975)
Mol. Cell. Biochem. 9, 175

Uniyal, J.P. & Laumas, K.R. (1976)
Biochem. Biophys. Acta 427, 218

Weichselbaum, T.E. (1946)
Amer. J. Clin. Path. 10, 40

Westphal, U. (1971)
in: Steroid-Protein Interactions 4, 1
(Gross, F., Labhard, M., Mann, T., Samuels, L.T. & Zander, J., Hrsg.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

Williams, D. & Gorski, J. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 258

Wittliff, J.L., Hilf, R., Brooks, W.F., Savlov, E.D., Hall, T.C. & Orlando, R.A. (1971)
Cancer Res. 32, 1983

Wittliff, J.L., Gardner, D.G., Battema, W.L. & Gilbert, P.J. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 119

Wittliff, J.L. (1974)
Sem. Oncol. 1, 109

D a n k s a g u n g
==========

Hiermit möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Staib, dem Direktor des Physiologisch Chemischen Instituts II der Universität Düsseldorf, für die Bereitstellung eines Laborplatzes und Herrn Prof. Dr. H. Bojar aus dem Institut für Onkologische Biochemie der Universität Düsseldorf für die Überlassung des Themas, die vielfachen Ratschläge und die Durchsicht dieser Arbeit danken.

L e b e n s l a u f

27.11.1955	Geburt in Wesel als Tochter der Eheleute Hugo Volmering und Maria Volmering, geb. Duvenbeck
1962 - 1966	Besuch der kath. Volksschule an der Martinistraße in Wesel
1966 - 1974	Besuch des Städt. Neusprachl. Mädchengymnasiums in Wesel
Juli 1974 - März 1975	Tätigkeit als Aushilfe in der Pflege im Evang. Krankenhaus Wesel
ab April 1975	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf

Düsseldorf, den 8.7.81

Klara Volmering